

## **2. OBJETIVOS**



El principal objetivo de esta tesis es ahondar en la caracterización clínica, biológica y genética de la *Hiperplasia Suprarrenal Congénita, por déficit de la enzima 21-hidroxilasa* en la población de la Comunidad Autónoma de Cataluña, con el fin de poder realizar un diagnóstico etiológico concluyente, que permita el tratamiento que mejor se adapte a la situación fisiopatológica, así como establecer el consejo genético familiar y ofrecer un correcto diagnóstico y tratamiento prenatal.

En concreto, los objetivos propuestos son:

- Análisis e interpretación de las concentraciones séricas, basales y post estimulación con ACTH, de 17-hidroxiprogesterona obtenidas en los tres grupos de pacientes con esta deficiencia y en sus familiares.
- Elaboración de un Nomograma de referencia de la población estudiada que facilite el diagnóstico de las distintas formas de presentación clínica del déficit.
- Estudio indirecto del gen de la 21-hidroxilasa mediante la identificación de los antígenos del sistema HLA asociados a las diferentes formas clínicas.
- Análisis directo del gen 21-hidroxilasa mediante el empleo de diferentes estrategias metodológicas, para la detección de grandes reordenamientos y de nueve de las mutaciones puntuales más comunes, con objeto de poder establecer su distribución y frecuencia en la población estudiada.
- Valoración de la incidencia de mutaciones *de novo* en la población estudiada.
- Diagnóstico de portadores y formas crípticas, a partir del análisis mutacional familiar.
- Estudio de la correlación entre el tipaje HLA y las anomalías del gen 21-hidroxilasa detectadas en los pacientes.
- Descripción de la correlación entre el genotipo y el fenotipo en los pacientes objeto de análisis.



# 3. MATERIAL

Y

MÉTODOS



### **3.1. PACIENTES Y DIAGNÓSTICO CLÍNICO**

Se han estudiado un total de 71 pacientes (43 niñas y 28 niños), pertenecientes a 53 familias de la Comunidad Autónoma de Cataluña, diagnosticados de Hiperplasia Suprarrenal Congénita por déficit de la enzima 21-hidroxilasa procedentes de la Sección de Endocrinología del Hospital Universitari Sant Joan de Déu de Barcelona.

Según los síntomas clínicos que presentaron, los pacientes fueron clasificados, de acuerdo con los criterios habituales<sup>62</sup>, en los tres grupos que representan el espectro de anomalías característico de esta enfermedad: 13 perdedores de sal (SW); 5 virilizantes simples (SV) y 53 afectos de forma no clásica (NC).

En 50 de las familias, los dos padres colaboraron en el estudio; en otras 2 familias solo uno de los padres se analizó y en 1 ambos habían fallecido. Ninguno de ellos estaba clínicamente afecto de Hiperplasia Suprarrenal Congénita por déficit en 21-hidroxilasa. También participaron 41 hermanos sanos de los pacientes motivo de estudio.

De las familias analizadas, 37 tenían 1; 14 tenían 2, y 2 familias tenían 3 hijos afectos.

En total, el material en estudio representó 106 cromosomas no emparentados portadores de alteraciones causantes del déficit en 21-hidroxilasa.

Los pacientes con "pérdida salina" fueron diagnosticados por presentar crisis de "pérdida salina" con deshidratación, concentraciones plasmáticas de ion sodio inferiores a las fisiológicas y concentraciones plasmáticas de ion potasio y renina superiores a las fisiológicas en las primeras semanas de vida, restableciéndose después de una terapia con gluco y mineralocorticoides. También, se observaron concentraciones plasmáticas de 17-hidroxiprogesterona, testosterona, androstendiona y del metabolito urinario pregnanetriol superiores a las fisiológicas. La virilización al nacimiento se presentó en grado variable en pacientes femeninos, que oscilaba entre los tipos III y V de Prader.

Los pacientes con forma virilizante simple se diagnosticaron por la elevación en la infancia temprana de la concentración sérica de 17-hidroxiprogesterona. Al realizarse la exploración, las niñas presentaron genitales externos ambiguos y los niños una inapropiada virilización con macrogenitosomía y una edad ósea avanzada, en ambos.

Los pacientes con la forma no clásica, presentaron una pubarquia prematura, hirsutismo y edad ósea avanzada como signos más característicos, además de una respuesta elevada, al realizar estimulación con corticotropina (ACTH), de la 17-hidroxiprogesterona.

### **3.2. ASPECTOS ÉTICOS**

En lo que se refiere a la investigación clínica con los pacientes, se cumplieron fielmente en este estudio las recomendaciones de la declaración de derechos humanos de Helsinki sobre personas objeto de investigación.

Todos los familiares y/o tutores, fueron informados por escrito del objeto y desarrollo del estudio, dando su consentimiento al mismo.

### **3.3. DETERMINACIONES HORMONALES**

A todos los pacientes y algunos familiares se les practicó una prueba de estimulación con corticotropina (test de ACTH), mediante administración por vía intramuscular de 0,25 mg de Synacthen (corticotropina sintética) y valoración por duplicado mediante radioinmunoensayo (Medgenix Diagnostics) de las concentraciones séricas de 17-hidroxiprogesterona (17-OHP) antes y tras 30 minutos de la inyección.

Los coeficientes de variación inter/intraensayo para 17-OHP han sido de (6,4% para un valor  $\bar{x}$ : 6,0 nmol/L / 6,7% para un valor  $\bar{x}$ : 7,1 nmol/L).

Como grupo control, se consideró a 40 niños, de edades similares a la de los pacientes y cuyos valores basales de 17-OHP fueron inferiores a 6 nmol/L (+2sd) y post estimulación con ACTH inferiores a 9,1 nmol/L (+2sd), siendo estos nuestros límites de normalidad.

### **3.4. IDENTIFICACIÓN DE LOS ANTÍGENOS DEL SISTEMA HLA (ANTÍGENOS LEUCOCITARIOS HUMANOS)**

El tipaje de los antígenos HLA correspondientes a las moléculas de Clase I (locus A, B y C) y Clase II (locus DR y DQ) se determinó en 14 familias mediante la técnica de microlinfocitotoxicidad, definiendo serológicamente 18 antígenos del locus A, 35 del B, 8 del C, 12 del DR y 3 DQ.

Los antisueros utilizados para definir los antígenos de Clase I y Clase II fueron obtenidos localmente en el Laboratorio de Histocompatibilidad o procedían de intercambios con otros laboratorios.

La técnica de linfocitotoxicidad<sup>166</sup> se basa en la lesión de membrana producida por el complemento cuando reacciona con complejos antígeno - anticuerpo sobre las superficies celulares. Esta reacción tiene lugar en dos tiempos. En una primera incubación, se hace reaccionar el anticuerpo con los linfocitos y posteriormente se añade el complemento. Si los linfocitos son portadores del antígeno reconocido por el antisuero, tendrá lugar la lesión celular, citólisis, que se visualizará mediante los cambios producidos en la célula, ya sea directamente en microscopio de contraste de fase o con ayuda de un colorante vital (eosina).

Gracias a la ruptura de la membrana celular mediada por el complemento, penetra la eosina en el interior de las células y las hace aparecer como sombras oscuras. Si en éstas no ha tenido lugar ninguna reacción antígeno - anticuerpo, la vitalidad de los linfocitos diagnosticados permanece inalterada por el complemento añadido y en la imagen de contraste de fase se ofrecen de color claro.

Dado que los productos de los genes de la clase II normalmente sólo se manifiestan en macrófagos y linfocitos B, mientras que los de clase I se expresan en todas las células nucleadas así como en las plaquetas humanas, es necesaria la separación de estos linfocitos B de sangre periférica. Una de las técnicas utilizadas para aislar linfocitos B se basa en la propiedad que tienen estas células de adherirse, al igual que los monocitos, a la fibra de nylon<sup>167</sup>. Se incuban los linfocitos de sangre periférica en una cantidad de fibra de nylon previamente preparada, eluyendo los linfocitos T por gravedad, y se procede a separar mecánicamente los linfocitos B adheridos en ella.

La determinación de antígenos de Clase II se efectuó en linfocitos B con sueros específicos previamente absorbidos y comprobada su negatividad para antígenos de Clase I; mientras que los linfocitos T obtenidos durante el proceso serán utilizados para la determinación de antígenos de Clase I.

La técnica consiste en:

1.- *Tratamiento de la sangre desfibrinada y separación sobre Ficoll - Pielograf* : Las pruebas se realizan a partir de sangre venosa del paciente, desfibrinada inmediatamente después de la extracción sobre bolas de cristal por agitación rotatoria de la misma.

Los 20 mL de sangre desfibrinada se diluyen en un medio de NaCl al 8‰ tamponado (P.B.S.: Phosphate Buffer Saline). La separación de la sangre diluida con P.B.S. se efectúa en Ficoll - Pielograf, densidad 1.077 g/mL, en un tubo de fondo cónico, centrifugando a 2.000 r.p.m. durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Después de la centrifugación se obtienen 5 capas: la inferior que contiene los hematíes, sobre ella una capa blanca de leucocitos polinucleares, la capa de ficoll, la capa de células mononucleares y el plasma.

La suspensión linfocitaria recogida en la interfase plasma-ficoll, se deposita en tubos cónicos, añadiendo plasma autólogo y centrifugando durante 10 min. a 2.000 r.p.m. a fin de realizar el primer lavado. A continuación se decanta el sobrenadante y se recupera el sedimento, añadiendo hasta 10 mL de P.B.S. para realizar seguidamente el segundo y tercer lavado.

Finalizados los tres lavados, a la suspensión de células existentes en el sedimento añadiremos 0,5 mL de Medio de Cultivo (RPMI 1640) a 37°C.

2.- *Filtración* : Se colocan 200 mg de fibra de nylon (Fenwall-Leucopack) en una jeringa de 5 mL de polipropileno. Esta cantidad de fibra es suficiente para la separación de una suspensión de 40 millones células en un mL. Es importante que la fibra esté deshilachada y vaporosa.

Esta fibra sufre un tratamiento especial de lavados sucesivos con agua destilada, CIH 0,2N y medio de cultivo previamente calentado a 37°C; seguidamente se incuba durante 30 minutos a 37°C en posición vertical.

3.- *Incubación de las células* : Después de la incubación de la fibra contenida en la jeringa, se elimina el exceso de medio de cultivo presionando el émbolo hasta 2,5 mL.

Se vuelve a tapar el extremo inferior de la jeringa y se añade la suspensión de células problema gota a gota, incubándola durante 30 minutos a 37°C en estufa.

4.- *Recogida de linfocitos* : Finalizada la incubación, dejamos caer el contenido de la jeringa en un tubo cónico, añadiendo gota a gota a la jeringa, 10 mL del medio de cultivo calentado a 37°C. Estas células serán los linfocitos T.

Los linfocitos B, que han quedado adheridos a la fibra de nylon, se obtienen seguidamente colocando el émbolo en la jeringa, aspirando y presionando la fibra varias veces sobre una placa de petri con medio de cultivo a temperatura ambiente.

Las suspensiones celulares se ajustan a 3.000 células/ $\mu$ L.

5.- *Montaje en Placas Terasaki* : Los linfocitos B, son utilizados para el montaje de la placa que contiene los anticuerpos específicos para los antígenos DR. El montaje consiste en la adición de 1  $\mu$ L de linfocitos B a cada pocillo de la placa, comprobando que contacta con el antisuero; se incuba a 20°C durante 60 minutos; se añaden 5  $\mu$ L de suero de conejo, recién descongelado, como fuente de complemento. Luego, se incuba a 20°C durante 120

minutos, se añaden 3  $\mu$ L de eosina al 5‰ y se fija la reacción con 6  $\mu$ L de formol al 35% y pH 7,2. Después, se guardará en nevera y se leerá la reacción al día siguiente.

Con los linfocitos T, se realiza el tipaje del sistema HLA-A, B y C; utilizando placas Terasaki con antisueros específicos diferentes. El montaje es igual que el descrito para los linfocitos B, aunque los tiempos de incubación se reducen: 30 minutos para la incubación suero-linfocitos y 60 minutos después de haber añadido el complemento.

6.- *Lectura* : Las lecturas de las placas, pueden efectuarse a partir de los 30 minutos de finalizada la reacción, tiempo suficiente para que las células se hayan depositado en el fondo del pocillo. Si la lectura se demora 24 horas, es aconsejable guardar la placa a 4°C. La lectura se efectuará en un Microscopio Invertido de contraste de Fases, con el ocular 10x y el objetivo 25x.

Las células coloreadas y de mayor tamaño, son aquellas en que la reacción ha sido positiva, indicando que los linfocitos poseen el antígeno reconocido por el antisuero, cuya especificidad ha sido definida.

Las reacciones se valorarán de acuerdo con el siguiente índice:

- 0.- Reacción no valorable. Error técnico.
- 1.- Mortalidad hasta 20 %. Negativo.
- 2.- Mortalidad 21-40 %. Probable negativo.
- 4.- Mortalidad 41-60 %. Probable positivo.
- 6.- Mortalidad 61-80 %. Positivo.
- 8.- Mortalidad 81-100 %. Fuertemente positivo.

El resultado final de la lectura, nos permitirá tener conocimiento de los antígenos existentes en los diferentes locus del Sistema - HLA, en un determinado paciente.

Como grupo control de la población general para la distribución de los antígenos HLA se han seleccionado al azar 1.337 personas no emparentadas pertenecientes al panel del Laboratorio de Histocompatibilidad del Hospital Clínic de Barcelona. No se han usado personas de la misma edad y sexo, puesto que no existe evidencia de que la distribución de estos antígenos, genéticamente determinados, varíe con la edad o el sexo.

### **3.5. ANÁLISIS GENÉTICO MOLECULAR DEL GEN 21-OH**

#### **3.5.1. Obtención de DNA genómico a partir de leucocitos en sangre periférica:**

El objetivo de esta técnica es la obtención y purificación de DNA genómico a partir de sangre, concretamente obtendremos el DNA a partir de los leucocitos, donde se incluyen linfocitos, neutrófilos, basófilos, etc.

Dado que debemos tener leucocitos libres de eritrocitos y plasma, el primer paso consistirá en la obtención de los leucocitos, posteriormente lisaremos estas células, separaremos el DNA de las proteínas, membranas y otros restos celulares y, por último purificaremos y cuantificaremos el DNA.

#### Protocolo

Para la obtención del DNA de todos los pacientes y familiares incluidos en el estudio, se ha utilizado el método de extracción salina<sup>168</sup>.

- Partir de 15-20 mL de sangre periférica con anticoagulante EDTA.
- Añadir suero fisiológico hasta un volumen de 50 mL (tubos estériles de polipropileno de 50 mL), y mezclar suavemente por inversión.
- Centrifugar a 2.000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C.
- Eliminar la fase superior mediante una pipeta Pasteur, con cuidado de no llevarse la interfase de leucocitos.
- Añadir solución de lisis de eritrocitos hasta un volumen de 50 mL. Agitar suavemente.
- Centrifugar a 3.500 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C.
- Desestimar el sobrenadante por decantación.
- Añadir de nuevo solución de lisis de eritrocitos hasta 50 mL. Agitar suavemente.
- Centrifugar a 3.500 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C.
- Desestimar el sobrenadante por decantación.
- El botón de leucocitos obtenido puede ser guardado a -20°C o bien continuar con el proceso de extracción.
- Añadir 3 mL de solución de lisis de leucocitos, 200 µL de SDS 10% y 500 µL de solución de proteinasa K. Agitar hasta que la muestra tenga un aspecto homogéneo.
- Incubar a 37°C en agitación durante toda la noche.

- Añadir 1 mL de NaCl 5 M saturado. Agitar.
- Centrifugar a 3.500 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C.
- Traspasar el sobrenadante a un nuevo tubo y centrifugar de nuevo para eliminar el máximo de sales, que podrían interferir en la digestión del DNA o en su amplificación por PCR.
- Añadir cloroformo (v/v) y mezclar. Este paso se realiza para obtener una muestra más pura y para eliminar los restos de eritrocitos que pueden haberse arrastrado. Cuando el sobrenadante no es rojizo, se puede obviar este paso.
- Centrifugar a 3.500 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C.
- Recuperar la fase superior (transparente) con cuidado de no coger nada de la interfase, mediante una pipeta Pasteur de plástico a un nuevo tubo.
- Añadir 2 volúmenes de etanol absoluto y mezclar lentamente para conseguir que el DNA se vaya compactando (medusa).
- Recuperar el DNA utilizando una pipeta Pasteur de cristal y lavar con etanol 70 % para eliminar el exceso de sales.
- Una vez seco, pasar el DNA a un tubo estéril eppendorf de 2 mL con aproximadamente 1 mL (dependiendo del tamaño del precipitado de DNA obtenido) de solución Tris 10 mM/EDTA 0,2 mM.
- Resuspender el DNA a 37°C durante unas horas.

◆ *Cálculo de la concentración de DNA.*

La cuantificación de la concentración de DNA se ha realizado en un espectrofotómetro. Normalmente se prepara una dilución 1:20 de la muestra a leer y se mide la absorbancia a 260 nm y a 280 nm de longitud de onda. El valor que nos dé a 260 nm es proporcional a la cantidad de DNA. Para calcular la concentración de DNA se multiplica el valor de D.O.<sub>260</sub>, por la dilución hecha y por 50 (1 unidad de D.O. corresponde a 50 µg/mL de DNA de cadena doble), el resultado se expresa en µg/mL. El cociente entre D.O.<sub>260</sub>/D.O.<sub>280</sub> indica la proporción de proteínas y por lo tanto, la pureza del DNA. Se aconseja trabajar con DNAs de purezas entre 1,7 y 2.

◆ *Soluciones.*

***Tampón de lisis de eritrocitos:***

5 mL de Tris 2 M pH 7,5

2,5 mL de MgCl<sub>2</sub> 1 M

	H <sub>2</sub> O hasta volumen 500 mL
	Preparar en el momento de utilizar
	Guardar a 4°C. Desechar pasados 8 días
<b><i>Tampón de lisis de leucocitos:</i></b>	40 mL de NaCl 5 M
	4 mL de EDTA (pH 8) 0,25M
	2,5 mL de Tris 2 M pH 7,5
	H <sub>2</sub> O hasta volumen 500 mL
	Guardar a temperatura ambiente
<b><i>Solución Proteinasa K:</i></b>	Proteinasa K 10 mg/mL
	SDS 1%
	EDTA 125mM (pH 8,0)
	Guardar a -20°C
<b><i>Cloroformo:</i></b>	480 mL de Cloroformo
	20 mL Alcohol isoamílico
	Saturar con 500 mL de Tris 20 mM, pH 8
	Guardar a 4°C en botella opaca a la luz
<b><i>NaCl 5 M:</i></b>	292,2 g. de NaCl
	H <sub>2</sub> O hasta volumen 1000 mL
	Autoclavar
	Guardar a temperatura ambiente
<b><i>NaOH 10 N:</i></b>	400 g. de gránulos de NaOH
	H <sub>2</sub> O hasta volumen 1000 mL
	Guardar a temperatura ambiente
<b><i>EDTA 0,5 M pH 8:</i></b>	9,31 g. de EDTA
	H <sub>2</sub> O hasta volumen 50 mL
	Ajustar pH a 8 con NaOH
	Filtrar y guardar a temperatura ambiente

<b>SDS 10 %:</b>	50 g. de SDS H <sub>2</sub> O hasta volumen 500 mL Calentar a 65°C para disolver la mezcla Guardar en botella opaca a la luz, a temperatura ambiente
<b>TE 10/0.2:</b>	Tris-HCl (pH 7,5) 10 mM EDTA (pH 8,0) 0,2 mM
<b>Tris 2M pH 7,5:</b>	242,2 g. de Tris H <sub>2</sub> O hasta volumen 1000 mL Ajustar pH a 7,5 con HCl Guardar a temperatura ambiente
<b>Etanol 70 %:</b>	70 mL de Etanol Absoluto H <sub>2</sub> O hasta volumen 100 mL Guardar a -20°C
<b>MgCl<sub>2</sub> 1M:</b>	9,52 g. de MgCl <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O hasta volumen 100 mL Filtrar y guardar a 4°C en botella opaca

### 3.5.2. Detección de Deleciones, Duplicaciones y Grandes Conversiones:

Para determinar la presencia de grandes reordenamientos en la región genómica analizada, se utilizó la técnica Southern blot. Esta técnica permite detectar genes y otras secuencias de DNA en fragmentos de restricción separados por electroforesis mediante la hibridación con una sonda específica marcada.

El análisis consiste en:

#### ◆ Digestión del DNA genómico con las enzimas de restricción: *Taq I* y *Bgl II*.

Se han digerido 10 µg de DNA genómico de cada una de las muestras, con 20 U de la enzima de restricción y 1/10 parte del tampón 10x específico para la enzima en un

volumen final de 50  $\mu$ L, durante toda la noche a la temperatura de actuación de la enzima. Las enzimas de restricción utilizadas han sido Taq I y Bgl II (Boehringer Mannheim) para las que son polimórficos el gen CYP21B y el pseudogen CYP21A, realizándose las dos digestiones simples por separado, las cuales se hibridaran posteriormente con la misma sonda específica marcada. Incubamos a 65°C las digestiones con Taq I y a 37°C las digestiones Bgl II. Una vez acabadas las digestiones realizamos la electroforesis de estas; para ello, se añade un 20% del tampón de carga a cada muestra y se cargan en un gel de agarosa al 1% las digestiones realizadas con Taq I y en un gel de agarosa al 0,8% las digestiones Bgl II. Los geles se corren a 70 V durante toda la noche, hasta que la posición de los colorantes del tampón de carga nos indiquen la conveniencia de detenerlas.

Se tiñen con bromuro de etidio para comprobar la digestión de las muestras.

◆ *Electroforesis en geles de agarosa convencionales.*

La electroforesis en geles de agarosa se realiza para separar fragmentos de DNA según su tamaño, haciéndolo pasar a través de un campo eléctrico. Para visualizar el DNA es necesario teñir el gel con bromuro de etidio, que se puede añadir cuando preparamos el gel a una concentración final de 0,5  $\mu$ g/mL, o bien se tiñe una vez acabada la electroforesis en una solución de bromuro de etidio y agua destilada.

La concentración de agarosa en el gel dependerá del tamaño del fragmento de DNA que queramos separar y suele oscilar entre un 0,5 % a un 3 %.

Preparación del gel

- Pesar la agarosa al porcentaje deseado.
- Disolver la agarosa en TBE 1x (se puede añadir el bromuro de etidio en este momento).
- Depositar la agarosa totalmente disuelta en el molde con el peine correspondiente. Este peine formará los pocillos donde se cargaran las muestras una vez esté solidificada la agarosa.
- Colocar el gel en una cubeta de electroforesis y añadir TBE 1x hasta que quede cubierta.
- Cargar las muestras previamente mezcladas con una solución de azul de bromofenol, al lado de un marcador de peso molecular.

- Conectar la corriente eléctrica. El voltaje oscilará entre los 20-100 Voltios y el tiempo de electroforesis entre 2-20 horas, dependiendo de los fragmentos a separar. Normalmente para la visualización de fragmentos de PCR es suficiente con 2-4 horas (50-100 Voltios) mientras que cuando se trata de separar los productos de una digestión de DNA genómico la electroforesis se realiza durante toda la noche (20-60 Voltios).
- Visualizar en un transiluminador de luz ultravioleta.
- Fotografiar el gel y colocar al lado del marcador de peso molecular una regla si posteriormente se quiere transferir a un filtro.

◆ *Soluciones.*

**TBE 1x:** Tris 90mM, Acido Bórico 72mM, EDTA 2,4mM.  
pH 8,3 con ácido acético

**Azul Bromofenol:** Azul bromofenol 0,25 %  
Xilencianol FF 0,25 %  
Ficoll (Type 400; Pharmacia) 15 % en H<sub>2</sub>O.

◆ *Electroforesis en geles de acrilamida.*

La utilidad de estos geles, al igual que los de agarosa, es la separación de las moléculas de DNA según su tamaño cuando se someten a un campo eléctrico. Se utilizan cuando los fragmentos que se quieren visualizar son muy pequeños, o bien cuando se quieren separar fragmentos con pocas bases de diferencia. La manera de visualizar el DNA en estos geles puede variar: tinción con bromuro de etidio, radioactividad, tinción con nitrato de plata o fluorescencia, todo en función de su aplicación.

Preparación del gel

- Limpiar bien con agua y jabón los cristales a utilizar. Secar y limpiar con etanol absoluto.
- Montar los cristales con los separadores y los peines, sellando los laterales con cinta adhesiva o con pinzas.



- Añadir solución desnaturalizante y dejar en agitación suave durante 1 hora.
- Decantar la solución cuidadosamente y lavar el gel con agua destilada.
- Añadir solución neutralizante y dejar en agitación suave durante 1 hora.
- Preparar una bandeja con SSC 10x cubierta con un cristal tapado por un puente de papel Whatmann 3MM (Schleicher & Schuell) mojado con SSC 10x.
- Colocar el gel sobre este puente.
- Colocar encima un filtro de nylon del mismo tamaño del gel, mojado previamente en SSC 3x. Los filtros utilizados han sido los Hybond (Amersham).
- Colocar unos 3 - 6 papeles Whatmann 3MM encima del filtro de nylon, 3 mojados de SSC 3x y 3 secos.
- Colocar varias capas de celulosa y encima un cristal sobre el cual se colocará un peso de aproximadamente 1 Kg.
- Cubrir la bandeja con papel de plástico para evitar la evaporación del tampón.
- El tiempo de transferencia es de unas 16-24 horas para los geles de agarosa convencionales.
- Transcurrido este tiempo, recuperar el filtro marcando uno de los extremos y lavarlo con SSC 2x.
- Fijar el DNA: la fijación puede ser por calor (80°C durante el tiempo aconsejado por el fabricante del filtro de nylon, oscila entre 15 minutos y 2 horas), o por luz ultravioleta (30 segundos).

◆ *Soluciones.*

**Sol. Depuración:** 0,25 N de HCl  
(20,7 mL de HCl 37 % en 1000 mL)  
Guardar a temperatura ambiente

**Sol. Desnaturalizante:** 300 mL de NaCl 5 M  
50 mL de NaOH 10 N  
H<sub>2</sub>O hasta volumen 1000 mL  
Guardar a temperatura ambiente

**Sol. Neutralizante:** 600 mL de NaCl 5 M

250 mL de Tris 2 M pH 7,5

H<sub>2</sub>O hasta volumen 1000 mL

Guardar a temperatura ambiente

**SSC 10x:**

NaCl 1,5 M; Citrato trisódico 0,15 M;

ajustar el pH 7 con HCl

◆ *Diseño y marcaje de una sonda específica para el gen 21-hidroxilasa.*

Para detectar una secuencia de DNA mediante transferencia Southern, se debe hibridar dicha secuencia con una sonda específica marcada. Este marcaje puede ser radioactivo, con biotina, con digoxigenina, etc. Es importante tener en cuenta que el marcaje se debe realizar utilizando un plásmido o un producto de PCR como molde para evitar marcajes inespecíficos de DNA, como podría ocurrir si se utilizara DNA genómico como molde.

Como DNA sonda a marcar se utilizó un producto de PCR de aproximadamente unos 429 pb que se extiende desde el nucleótido 1312 hasta el 1741 del gen 21-hidroxilasa, obtenido a partir de un DNA genómico control negativo para la enfermedad estudiada, procedente del banco de DNA propio del laboratorio.

Para marcar la sonda de DNA de cadena doble se ha utilizado el método de *random priming*<sup>170</sup>, que utiliza hexámeros, sintetizados al azar, como cebadores y como enzima el fragmento largo (klenow) de la DNA polimerasa I de *E. coli*. Se produce la síntesis de una copia de un fragmento de DNA, a la vez que se introducen nucleótidos modificados durante dicha síntesis.

### Protocolo

- Desnaturalizar entre 10-50 ng del DNA sonda a 98°C durante 10 minutos dependiendo del tamaño del fragmento de DNA que se marca, en un volumen de 50 µL. Colocar en hielo.
- Añadir: 10 µL de tampón de marcaje 5x  
4 µL de albúmina de suero bovino (BSA) (5mg/mL)  
2 µL de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP (800 Ci/mmol)  
12 U Enzima Klenow (Boehringer Mannheim)
- Incubar durante 2 horas a 37°C.

◆ *Soluciones.*

**Tampón 5x:** consiste en la mezcla de tres soluciones en las proporciones: Sol.A 100: Sol.B 250: Sol.C 150

Solución O: 1,25 M Tris-HCl; pH 8

0,125 M MgCl<sub>2</sub>

Solución A: 1 mL solución O

18 µL β-Mercaptoetanol

5 µL dATP; 5 µL dGTP; 5 µL dTTP

Los dATP, dGTP y dTTP están a 100 mM pH 7,5

Solución B: 2 M Hepes; pH 6,6

Solución C: Pd(N)<sub>6</sub> resuspendidos en TE 1/0,1

(90 Unidades de D.O./mL)

◆ *Eliminación de los nucleótidos libres de la sonda marcada.*

Protocolo

- Para separar los nucleótidos libres de la sonda marcada se utiliza una columna de Sephadex G-50 tamponada con SSC 3x, que se prepara en una jeringa de insulina de 1 mL.
- Llenar la jeringa con la solución de Sephadex G-50, previamente taponada con lana de vidrio.
- Centrifugar a 1.800 r.p.m. durante 4 minutos.
- Llevar la sonda marcada a un volumen final de 100 µL con SSC 3x.
- Introducirla en la columna.
- Centrifugar a 1.800 r.p.m. durante 4 minutos.
- Medir la actividad específica de 2 µL de la sonda recuperada en un contador β.

◆ *Soluciones.*

**Sephadex G50:** Sephadex G50 30 g

SSC 3x 300 mL

Agitar suavemente a 65°C durante 30 minutos

Cambiar 3 veces el SSC 3x

Autoclavar

**SSC 3x:** NaCl 450 mM; Citrato trisódico 45 mM; pH 7  
con HCl

◆ *Hibridación.*

Consiste en enfrentar una secuencia de DNA, normalmente fijada en una membrana de nylon, a una sonda específica marcada radioactivamente. Este proceso consta de 3 pasos: prehibridación del filtro para evitar uniones inespecíficas de la sonda; hibridación del filtro con la sonda; y lavado del filtro para eliminar las uniones inespecíficas y el exceso de sonda. Los procesos de prehibridación e hibridación se realizan en tubos de cristal en un horno de hibridación rotatorio (Hybaid). La cantidad de tampón de hibridación que se añade es directamente proporcional al tamaño del filtro, y suele ser de 0,2 mL por cm<sup>2</sup>. La hibridación se dejará durante toda la noche.

Protocolo Prehibridación-Hibridación

- Colocar el filtro en el tubo de hibridación y añadir el tampón de prehibridación previamente calentado a la temperatura de hibridación (65°C cuando la sonda es de cadena doble).
- Incubar durante 2 horas en movimiento suave y a la temperatura adecuada.
- La sonda marcada se desnaturaliza 7 minutos a 98°C, se coloca en hielo y se mezcla con el tampón de hibridación.
- Sustituir el tampón de prehibridación por el de hibridación con la sonda marcada y dejar en movimiento rotatorio suave durante toda la noche a 65°C.

◆ *Soluciones.*

<b>Tampón de Prehibridación:</b>	Tampón fosfato sódico 0,05M; pH 6,8
	DNA esperma salmón 25mg/500mL tampón
	Pirofosfato 0,1 %
	SDS 0,1 %
	Heparina 1 %

SSC	4x
Denhardt's	5x

***Tampón de Hibridación:*** Igual que el de prehibridación pero con 10% de sulfato de dextrano.

***Denhardt's 50x:***

- 5 g Ficoll
- 5 g albúmina de suero bovino (BSA)
- 5 g Polivinilpirrolidona
- H<sub>2</sub>O hasta un volumen de 500 mL

◆ *Lavado de los filtros.*

Se realizan una serie de lavados, que eliminan la sonda que se haya podido unir de forma inespecífica.

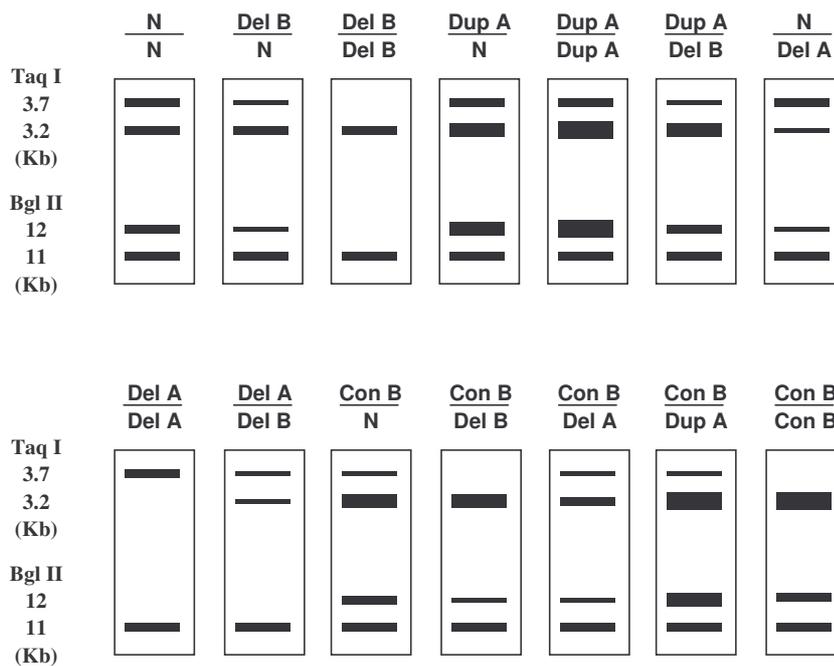
Protocolo

- Los lavados se realizan con soluciones de concentraciones decrecientes de SSC (2x, 1x, 0,5x y 0,1x) con un 0,1 % de SDS:
  - \* 2xSSC/0,1%SDS a temperatura ambiente 15 minutos en agitación suave
  - \* 1xSSC/0,1%SDS a 65°C, 30 minutos en agitación suave
  - \* 0,5xSSC/0,1%SDS a 65°C, 30 minutos en agitación suave
  - \* 0,1xSSC/0,1%SDS a 65°C, 20 minutos en agitación suave
- Después de cada lavado se controlan los filtros con un contador Geiger. Se considera que el filtro está limpio cuando el contador indica entre 2-5 cuentas por segundo.
- Plastificar el filtro para evitar que se seque y colocarlo en un chasis.
- Exponer el filtro a una película sensible a rayos X a temperatura ambiente o a -80°C durante 18 a 72 horas.
- Revelar.
- Los filtros se pueden reutilizar varias veces si se deshibridan y guardan a temperatura ambiente.

Las intensidades relativas de ambas bandas asociadas al gen CYP21B y pseudogen CYP21A se midieron por densitometría óptica.

◆ *Patrón de bandas observado.*

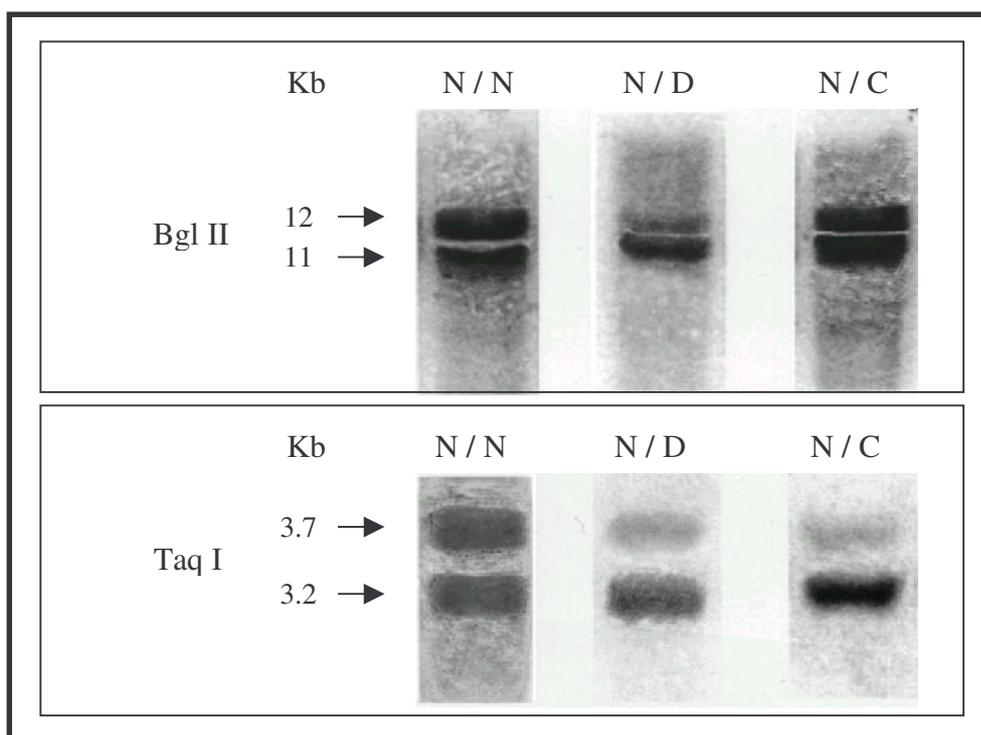
El análisis de los fragmentos de restricción generados por las distintas enzimas, para los que son polimórficos el gen CYP21B y el pseudogen CYP21A, permite evaluar el número relativo de copias de ambos. Los tamaños de los fragmentos originados a partir de gen y pseudogen normales y la posición del sitio polimórfico se muestra en la figura 1.15 Taq I y Bgl II. La evaluación densitométrica permite determinar la intensidad relativa de los fragmentos asociados a gen y pseudogen, la cual define el número de copias relativo de ambos. En la figura 3.1 se muestran las distintas posibilidades descritas, según combinaciones posibles de alelos que lleven duplicaciones, deleciones o conversiones del gen CYP21B o del pseudogen CYP21A.



**Figura 3.1:** Esquemas que muestran reordenamientos del gen CYP21 según el número relativo de copias de gen y pseudogen, deducidos a partir de la diferencia de intensidades de hibridación de los fragmentos polimórficos originados por las enzimas de restricción Taq I y Bgl II. (*N*: Normal; *Del B*: Delección CYP21B; *Dup A*: Duplicación CYP21A; *Del A*: Delección CYP21A; *Con B*: Conversión CYP21B)

La conversión de un sitio de restricción hace disminuir la intensidad de la banda asociada a gen o pseudogen según el caso, manteniéndose un patrón normal con la otra

enzima. Mientras que, en las deleciones y duplicaciones, el patrón debe de mantenerse para todas las enzimas. La ausencia de una de las bandas, mantenida para todas las enzimas de restricción, supone que ambos alelos carecen de una de las entidades, sea gen o pseudogen. La reducción de la señal de una de ellas, con respecto a la otra, a la mitad implica la existencia de deleción en heterozigosis, de nuevo ésta puede ser del gen o del pseudogen. El incremento en la intensidad de una de las bandas corresponde a la existencia de una duplicación (Fig. 3.2).



**Figura 3.2:** Ejemplos de patrones de Southern obtenidos con dos enzimas de restricción.  
(N: Normal; D: Deleción; C: Conversión)

### 3.5.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR):

La PCR es una técnica que se utiliza para amplificar *in vitro* fragmentos concretos de DNA de los cuales normalmente conocemos, al menos, las secuencias que los flanquean; permitiéndonos obtener grandes cantidades (varios microgramos) de estos, a partir de cantidades pequeñas de muestra (1 ng. o menos). El método se basa en: 1) Desnaturalización de la doble hélice de DNA; 2) "Annealing" o unión específica de dos oligonucleótidos o cebadores que flanquean la región a amplificar y sirven para iniciar la síntesis del fragmento; 3) Extensión de los cebadores por acción de una polimerasa

específica que soporta altas temperaturas sin desnaturalizarse. Este proceso en tres pasos se repite durante 25-35 ciclos en un aparato específico (termociclador) de forma que se consigue una amplificación exponencial del fragmento de interés. Las condiciones de amplificación del DNA<sup>171</sup> dependen en gran parte de la región del genoma que se quiere analizar. En cada amplificación se han utilizado las siguientes condiciones generales, sobre las que se han realizado variaciones, con el fin de mejorar el resultado: en tubo eppendorf de PCR añadimos 100-200 ng de DNA, 200 mM dNTPs, 15-30 pmols de cada cebador, 50 mM KCl, 10 mM Tris (pH 8,3), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 U Taq Polimerasa (Perkin-Elmer; Boehringer Mannheim), en un volumen final de 25 µL.

Las condiciones de la reacción:

*Primera desnaturalización:*                      94°C                      10 min.

30-35 ciclos en un termociclador (Perkin-Elmer) de:

Desnaturalización:    94°C                      30 seg.

Annealing:                      54-65°C                      30 seg.

Extensión:                      72°C                      30 seg. - 5 min.

*Extensión final:*                                      72°C                      5 min.

Todas las reacciones de PCR fueron realizadas y analizadas en áreas de trabajo separadas para prevenir posibles contaminaciones, especialmente durante las reamplificaciones, por lo que en todos los casos fue añadido un control negativo.

### **3.5.4. Detección de Mutaciones Puntuales:**

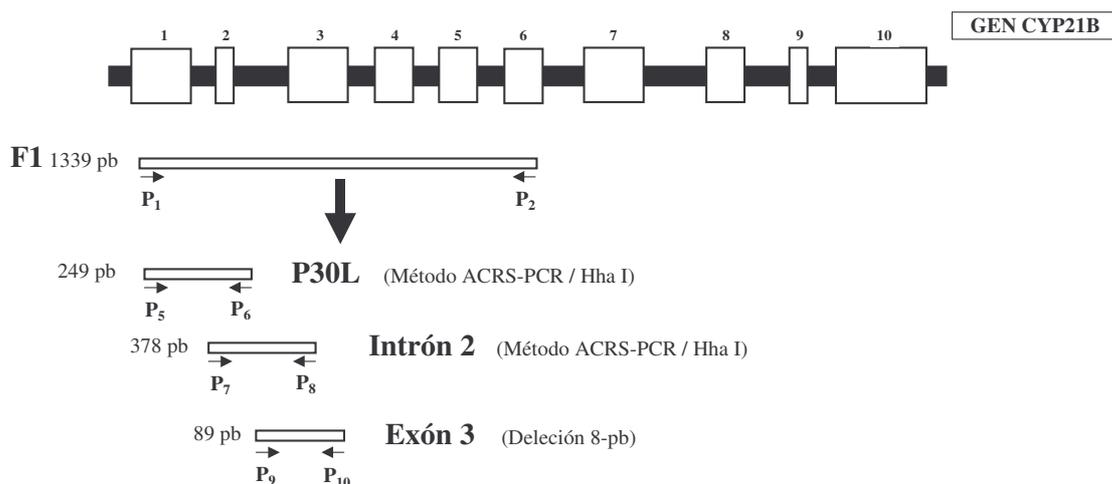
Nueve de las mutaciones más comunes del gen 21-hidroxilasa se han analizado en todos los individuos motivo del estudio, empleándose diferentes estrategias para su detección. Una de ellas implica la ganancia o pérdida de al menos un único lugar de restricción en el producto de PCR amplificado a partir de DNA genómico. También se ha recurrido a la creación de un lugar de restricción, mediante amplificación (ACSR-PCR)<sup>172</sup>. Consiste en la utilización de un par de cebadores para cada mutación, uno de ellos normal mientras que el otro presenta un nucleótido cambiado en el extremo 3'. Este último es el anterior al mutado y no está presente ni en la secuencia normal ni en la mutada, sino que sirve para que, junto a la mutación, la secuencia resultante contenga un sitio de restricción en el alelo normal o mutado, que pueda ser reconocido por una enzima de restricción.

El DNA genómico (100 ng) de cada muestra en estudio, se amplificó mediante PCR empleando cebadores específicos para la amplificación del gen CYP21B y no del pseudogen CYP21A. Las zonas empleadas para lograr la especificidad fueron: exón 3 en el que existe una delección de 8 pares de bases y exón 6 en el que existe una triple mutación, ambas en el pseudogen CYP21A.

El gen CYP21B se amplificó en dos fragmentos solapados, para ello realizamos dos PCR (F1 y F2):

- PCR-F1: Amplifica desde el exón 1 hasta el exón 6 (Fig. 3.3), obteniéndose un producto de 1339 pb. La reacción de PCR se realizó añadiendo: 1  $\mu$ L de DNA genómico estudio [250  $\mu$ g/mL]; 18,2  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O bidestilada estéril; 2,5  $\mu$ L de Tampón 10x con MgCl<sub>2</sub>; 1  $\mu$ L de dNTPs (5mM); 1  $\mu$ L del cebador directo (F) [10 pmol/ $\mu$ L]; 1  $\mu$ L del cebador reverso (R) [10 pmol/ $\mu$ L]; 0,3  $\mu$ L de la Taq Polimerasa. Se utilizaron los cebadores P1 y P2, este último específico del gen CYP21B (Tabla III.I). El programa de Termociclador a utilizar fue:

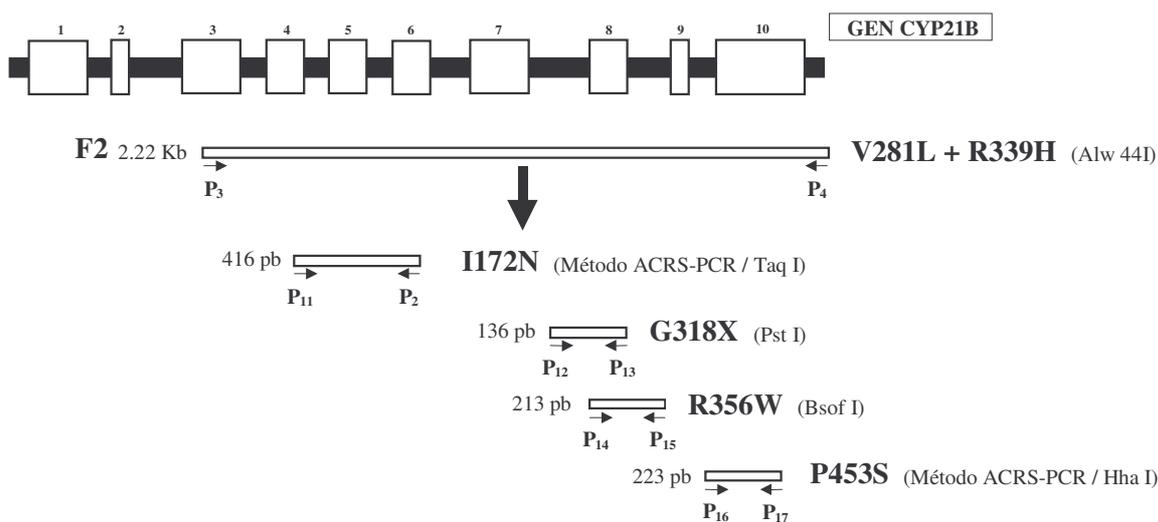
1 ciclo            96°C durante 3 minutos  
 35 ciclos de    94°C durante 30 segundos  
                     60°C durante 30 segundos  
                     72°C durante 2 minutos  
 Finalizar con 1 ciclo ininterrumpido a 4°C



**Figura 3.3:** Esquema que muestra la localización de los cebadores utilizados para detectar las mutaciones P30L, Intrón 2 y Exón 3 (delección 8-pb).

-PCR-F2: Amplifica desde el exón 3 hasta el exón 10 (Fig. 3.4), obteniéndose un producto de 2220 pb. La reacción de PCR se realizó añadiendo: 1  $\mu$ L de DNA genómico estudio [250  $\mu$ g/mL]; 18,2  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O bidestilada estéril; 2,5  $\mu$ L de Tampón 10x con MgCl<sub>2</sub>; 1  $\mu$ L de dNTPs (5mM); 1  $\mu$ L del cebador directo (F) [10 pmol/ $\mu$ L]; 1  $\mu$ L del cebador reverso (R) [10 pmol/ $\mu$ L]; 0,3  $\mu$ L de la Taq Polimerasa. Se utilizaron los cebadores P3, específico del gen CYP21B, y P4 (Tabla III.I). El programa de Termociclador a utilizar fue:

1 ciclo            96°C durante 3 minutos  
 35 ciclos de    94°C durante 30 segundos  
                   61°C durante 30 segundos  
                   72°C durante 4 minutos  
 Finalizar con 1 ciclo ininterrumpido a 4°C



**Figura 3.4:** Esquema que muestra la localización de los cebadores utilizados para detectar las mutaciones V281L + R339H, I172N, G318X, R356W y P453S.

-Testado de las PCR F1 y F2: con el producto obtenido de las PCR, se realiza una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% para testar la amplificación. En el primer pocillo del gel cargar el marcador de 1 Kb y en los pocillos siguientes una *mix* con 5  $\mu$ L de producto de PCR y 1  $\mu$ L del tampón de carga 6x para cada una de las muestras. Aplicar bajo voltaje (60-100V) durante el tiempo necesario hasta que el colorante BB migre entre 5 y 10 cm. Teñir con Bromuro de Etidio. Debe observarse la banda correspondiente a la fracción de DNA amplificado correspondiendo con el tamaño en pb esperado.

Una vez comprobada la amplificación de las muestras en las PCR F1 y F2, se realiza dilución 1:100 para los productos de la F1 y 1:120 para los productos de la F2.

A partir de la dilución 1:100 de los productos de la F1, mediante posteriores reamplificaciones por PCR y digestiones de los productos de estas con enzimas de restricción específicas, se detectarán las mutaciones P30L; Intrón 2 y Exón 3 (delección 8-pb).

Para ello, de cada tubo de dilución 1:100 se realizan tres PCR independientes cada una de las cuales permitirá detectar una mutación (P30L; Intrón 2 y Exón 3). Todas se realizan con las mismas cantidades de reacción de PCR mencionadas en F1, pero con cebadores distintos según la mutación (cebadores P5 y P6 para la mutación P30L; P7 y P8 para la mutación Intrón 2 y cebadores P9 y P10 para la mutación Exón 3) (Tabla III.I).

El programa de Termociclador utilizado para las tres PCR es el mismo:

1 ciclo            96°C durante 3 minutos  
 35 ciclos de    94°C durante 30 segundos  
                       60°C durante 30 segundos  
                       72°C durante 1 minuto  
 1 ciclo            72°C durante 5 minutos

Finalizar con un ciclo ininterrumpido a 4°C

A partir de la dilución 1:120 de los productos de la F2, mediante posteriores reamplificaciones por PCR y digestiones de los productos de estas con enzimas de restricción específicas, se detectarán las mutaciones I172N; G318X; R356W y P453S.

Para ello, de cada tubo de dilución 1:120 se realizan cuatro PCR independientes cada una de las cuales permitirá detectar una de las

**Tabla III.I:** Cebadores utilizados para el análisis de las mutaciones del gen CYP21B. Los nucleótidos modificados se indican subrayados.

Cebador	Secuencia
P <sub>1</sub>	5' TGGAACTGGTGGGAAGCTCCGG 3'
P <sub>2</sub>	5' GCATCTCCACGATGTGA 3'
P <sub>3</sub>	5' TTGTCCTTGGGAGACTACTCC 3'
P <sub>4</sub>	5' ACCTCTCGACCCCCAGTATGACT 3'
P <sub>5</sub>	5' GCTCCGGAGCCTCCACCTCG 3'
P <sub>6</sub>	5' TTGGAGTTCAGCACCAC 3'
P <sub>7</sub>	5' GTGGTGCTGAACTCCAA 3'
P <sub>8</sub>	5' ACACCAGCTTGCTGCAGGAGGGC 3'
P <sub>9</sub>	5' AGCCCCAACTCCTCCTGCA 3'
P <sub>10</sub>	5' TGTGGGCTTCCAGAGC 3'
P <sub>11</sub>	5' TCTCTCCTCACCTGCAGCATCG 3'
P <sub>12</sub>	5' ACCGGCCACTCAGGCTCACTGGG 3'
P <sub>13</sub>	5' GCCAGTTCGTGGTCTAGC 3'
P <sub>14</sub>	5' CAGCGACTGCAGGAGGAGCTA 3'
P <sub>15</sub>	5' GCTCGGGCTTTCCTCACTCAT 3'
P <sub>16</sub>	5' TGTGGTGGAGGCTGGTCCCCG 3'
P <sub>17</sub>	5' AGGGCAGGGCGTCCCCGGAGC 3'

anteriormente citadas mutaciones. Todas se realizan con las mismas cantidades de reacción de PCR mencionadas en F2, pero con cebadores distintos según la mutación (cebadores P11 y P2 para la mutación I172N; P12 y P13 para la mutación G318X; P14 y P15 para la mutación R356W y cebadores P16 y P17 para la mutación P453S) (Tabla III.I).

Las cuatro PCR se realizaron con el mismo programa de Termociclador:

1 ciclo            96°C durante 3 minutos  
 35 ciclos de    94°C durante 30 segundos  
                       60°C durante 30 segundos  
                       72°C durante 1 minuto  
 1 ciclo            72°C durante 5 minutos  
 Finalizar con un ciclo ininterrumpido a 4°C

Con el producto obtenido de las siete anteriores PCR, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% para comprobar la amplificación. Debe observarse la banda correspondiente a la fracción de DNA amplificado correspondiendo con el tamaño en pb esperado (Figuras 3.3 y 3.4).

Las mutaciones V281L y R339H se detectaron al mismo tiempo, mediante la digestión directa del producto amplificado F2.

-Digestión de los productos de PCR: Para detectar la presencia o ausencia de las mutaciones es necesario proceder a la digestión del producto de PCR con una enzima de restricción específica, excepto en la mutación Exón 3 (delección 8-pb) que no requiere de dicho procedimiento (Tabla III.II).

**Tabla III.II:** Características del análisis mutacional en el gen CYP21B.

Mutación	Cebadores	Producto PCR (pb)	Enzima de restricción	Tamaño de los fragmentos (pb)	
				Normal	Mutado
Pro-30-Leu	P <sub>5</sub> P <sub>6</sub>	249	HhaI	21, 228	249
Intrón 2	P <sub>7</sub> P <sub>8</sub>	378	HhaI	378	24, 354
Delección 8-pb	P <sub>9</sub> P <sub>10</sub>	89	-----	89	81
Ile-172-Asn	P <sub>11</sub> P <sub>2</sub>	416	TaqI	416	22, 394
Val-281-Leu + Arg-339-His	P <sub>3</sub> P <sub>4</sub>	2219	Alw 44I	376, 853, 990	853, 1366 990, 1229
Gln-318-Stop	P <sub>12</sub> P <sub>13</sub>	136	PstI	25, 111	136
Arg-356-Trp	P <sub>14</sub> P <sub>15</sub>	213	BsofI	9, 33, 81, 90	33, 81, 99
Pro-453-Ser	P <sub>16</sub> P <sub>17</sub>	223	HhaI	2, 23, 51, 147	2, 74, 147

### 3.5.4.1. Mutación P30L

Se realiza digestión con la enzima de restricción HhaI del producto de PCR obtenido al amplificar con los cebadores específicos para esta mutación P5, con una modificación que da lugar a una diana de restricción para esta enzima cuando la mutación no está presente, y P6 (Fig. 3.3).

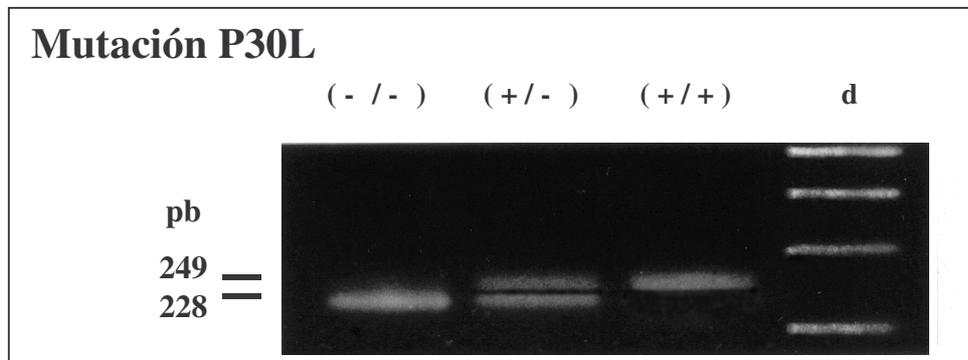
Se realiza en tubo eppendorf de 1.5 mL y para una reacción colocamos:

- 5  $\mu$ L del producto PCR
- 3  $\mu$ L H<sub>2</sub>O bidestilada estéril
- 1  $\mu$ L del tampón para la enzima HhaI
- 1  $\mu$ L de Enzima HhaI

Incubar en baño maría a 37°C durante un mínimo de 3 horas, pudiéndose prolongar durante toda la noche.

Finalizada la digestión, hacer un *spin* y realizar una electroforesis en gel de acrilamida al 8%. Aplicar alto voltaje 8-30 W. Teñir el gel con Bromuro de Etidio.

Interpretación de resultados:



Banda correspondiente al alelo normal de 228pb.

Banda correspondiente al alelo mutado de 249pb.

( - / - ) No portador de la mutación.

( + / - ) Heterocigoto para la mutación.

( + / + ) Homocigoto para la mutación.

d: 100-pb DNA ladder (Gibco-BRL Life Technologies, Gaithersburg, MD).

### 3.5.4.2. Mutación Intrón 2

Se realiza digestión con la enzima de restricción HhaI del producto de PCR obtenido al amplificar con los cebadores específicos para esta mutación P7 y P8, este último modificado, dando lugar a una diana de restricción para la enzima sólo cuando el nucleótido G (mutado) esté presente (Fig. 3.3).

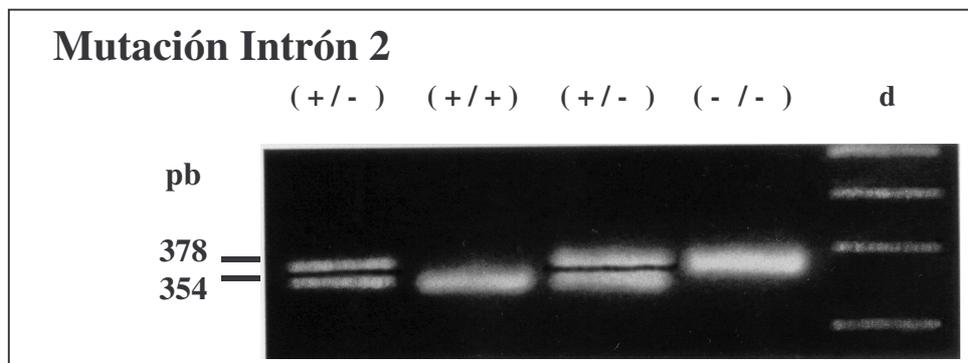
Se realiza en tubo eppendorf de 1.5 mL y para una reacción colocamos:

- 2  $\mu$ L del producto PCR
- 6  $\mu$ L H<sub>2</sub>O bidestilada estéril
- 1  $\mu$ L del tampón para la enzima HhaI
- 1  $\mu$ L de Enzima HhaI

Incubar en baño maría a 37°C durante un mínimo de 3 horas, pudiéndose prolongar durante toda la noche.

Finalizada la digestión, hacer un *spin* y realizar una electroforesis en gel de acrilamida al 8%. Aplicar alto voltaje 8-30 W. Teñir el gel con Bromuro de Etidio.

Interpretación de resultados:



Banda correspondiente al alelo normal de 378pb.

Banda correspondiente al alelo mutado de 354pb.

(- / -) No portador de la mutación.

(+ / -) Heterocigoto para la mutación.

(+ / +) Homocigoto para la mutación.

d: 100-pb DNA ladder (Gibco-BRL Life Technologies, Gaithersburg, MD).

### 3.5.4.3. Mutación P453S

Se realiza digestión con la enzima de restricción HhaI del producto de PCR obtenido al amplificar con los cebadores específicos para esta mutación P16 y P17, este último modificado, dando lugar a una diana de restricción para la enzima cuando esta mutación no está presente (Fig. 3.4).

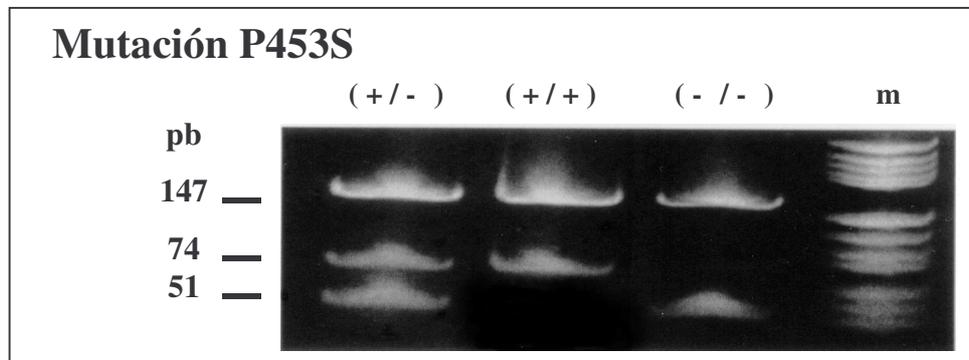
Se realiza en tubo eppendorf de 1.5 mL y para una reacción colocamos:

- 5  $\mu$ L del producto PCR
- 3  $\mu$ L H<sub>2</sub>O bidestilada estéril
- 1  $\mu$ L del tampón para la enzima HhaI
- 1  $\mu$ L de Enzima HhaI

Incubar en baño maría a 37°C durante un mínimo de 3 horas, pudiéndose prolongar durante toda la noche.

Finalizada la digestión, hacer un *spin* y realizar una electroforesis en gel de acrilamida al 8%. Aplicar alto voltaje 8-30 W. Teñir el gel con Bromuro de Etidio.

Interpretación de resultados:



Bandas correspondientes al alelo normal de 147pb y 51pb.

Bandas correspondientes al alelo mutado de 147pb y 74pb.

(-/-) No portador de la mutación.

(+/-) Heterocigoto para la mutación.

(+/+) Homocigoto para la mutación.

m: DNA marker V (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany).

#### 3.5.4.4. Mutación G318X

Se realiza digestión con la enzima de restricción PstI del producto de PCR obtenido al amplificar con los cebadores específicos para esta mutación P12 y P13, ninguno de ellos modificado (Fig. 3.4). Cuando esta mutación está presente, hay una pérdida de la diana de restricción para la enzima.

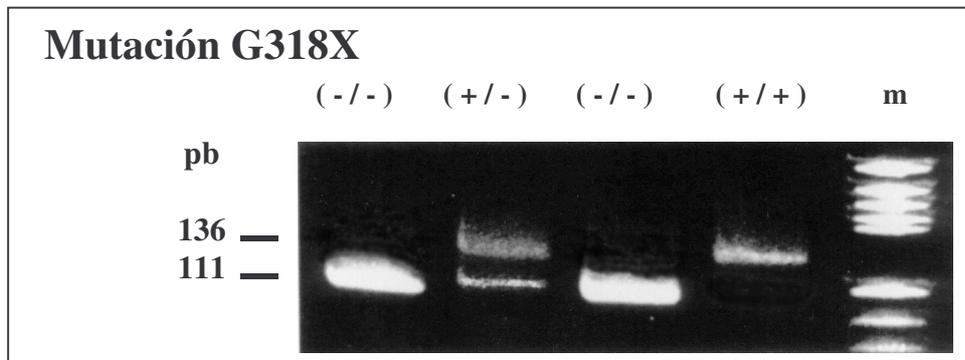
Se realiza en tubo eppendorf de 1.5 mL y para una reacción colocamos:

- 5  $\mu$ L del producto PCR
- 3  $\mu$ L H<sub>2</sub>O bidestilada estéril
- 1  $\mu$ L del tampón para la enzima PstI
- 1  $\mu$ L de Enzima PstI

Incubar en baño maría a 37°C durante un mínimo de 3 horas, pudiéndose prolongar durante toda la noche.

Finalizada la digestión, hacer un *spin* y realizar una electroforesis en gel de acrilamida al 8%. Aplicar alto voltaje 8-30 W. Teñir el gel con Bromuro de Etidio.

Interpretación de resultados:



Banda correspondiente al alelo normal de 111pb.

Banda correspondiente al alelo mutado de 136pb.

(- / -) No portador de la mutación.

(+ / -) Heterocigoto para la mutación.

(+ / +) Homocigoto para la mutación.

m: DNA marker V (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany).

### 3.5.4.5. Mutación R356W

Se realiza digestión con la enzima de restricción BsofI del producto de PCR obtenido al amplificar con los cebadores específicos para esta mutación P14 y P15, ninguno de ellos modificado (Fig. 3.4). Esta mutación produce pérdida de la diana de restricción para esta enzima.

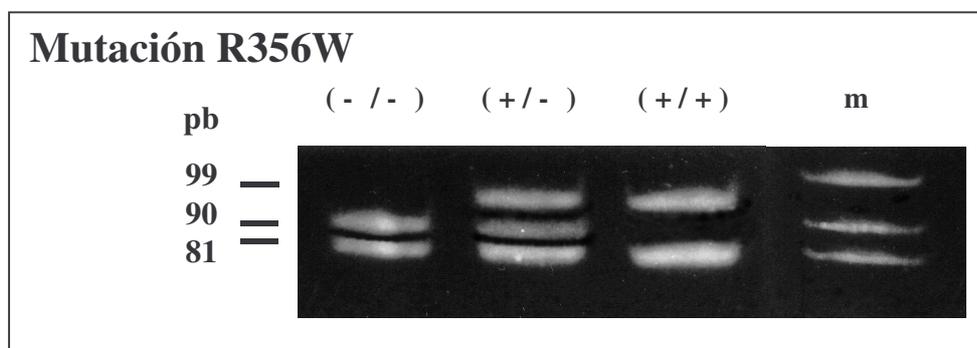
Se realiza en tubo eppendorf de 1.5 mL y para una reacción colocamos:

- 5  $\mu$ L del producto PCR
- 3  $\mu$ L H<sub>2</sub>O bidestilada estéril
- 1  $\mu$ L del tampón para la enzima BsofI
- 1  $\mu$ L de Enzima BsofI

Incubar en baño maría a 37°C durante un mínimo de 3 horas, pudiéndose prolongar durante toda la noche.

Finalizada la digestión, hacer un *spin* y realizar una electroforesis en gel de acrilamida al 8%. Aplicar alto voltaje 8-30 W. Teñir el gel con Bromuro de Etidio.

Interpretación de resultados:



Bandas correspondientes al alelo normal de 90pb y 81pb.

Bandas correspondientes al alelo mutado de 99pb y 81pb.

(- / -) No portador de la mutación.

(+ / -) Heterocigoto para la mutación.

(+ / +) Homocigoto para la mutación.

m: DNA marker V (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany).

### 3.5.4.6. Mutación I172N

Se realiza digestión con la enzima de restricción Taq I del producto de PCR obtenido al amplificar con los cebadores específicos para esta mutación P11, se modifica creando una diana de restricción para la enzima cuando la mutación está presente, y P2 (Fig. 3.4).

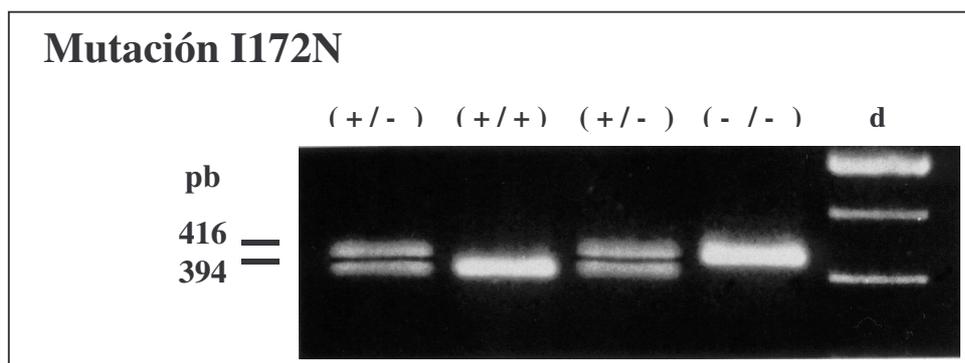
Se realiza en tubo eppendorf de 1.5 mL y para una reacción colocamos:

- 5 µL del producto PCR
- 3 µL H<sub>2</sub>O bidestilada estéril
- 1 µL del tampón para la enzima Taq I
- 1 µL de Enzima Taq I

Incubar en baño maría a 65°C durante toda la noche.

Finalizada la digestión, hacer un *spin* y realizar una electroforesis en gel de acrilamida al 8%. Aplicar alto voltaje 8-30 W. Teñir el gel con Bromuro de Etidio.

Interpretación de resultados:



Banda correspondiente al alelo normal de 416pb.

Banda correspondiente al alelo mutado de 394pb.

(- / -) No portador de la mutación.

(+ / -) Heterocigoto para la mutación.

(+ / +) Homocigoto para la mutación.

d: 100-pb DNA ladder (Gibco-BRL Life Technologies, Gaithersburg, MD).

### 3.5.4.7. Mutaciones V281L y R339H

Se realiza digestión con la enzima de restricción Alw44I del producto de PCR obtenido en la PCR-F2 directamente (Fig. 3.4). Ambas mutaciones producen una pérdida de la diana de restricción para esta enzima.

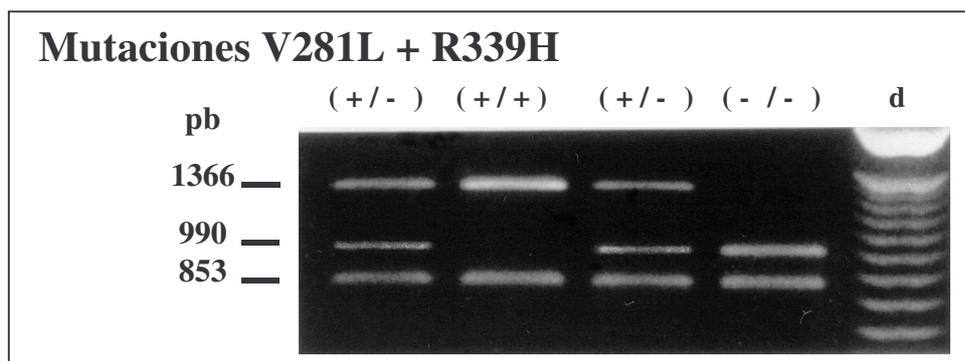
Se realiza en tubo eppendorf de 1.5 mL y para una reacción colocamos:

- 5  $\mu$ L del producto PCR-F2 sin diluir
- 7,2  $\mu$ L H<sub>2</sub>O bidestilada estéril
- 1,5  $\mu$ L del tampón para la enzima Alw44I
- 1,3  $\mu$ L de Enzima Alw44I

Incubar en baño maría a 37°C durante toda la noche.

Finalizada la digestión, hacer un *spin* y realizar una electroforesis en gel de acrilamida al 10%. Aplicar alto voltaje 8-30 W. Teñir el gel con Bromuro de Etidio.

Interpretación de resultados:



Bandas correspondientes al alelo normal de 990pb, 853pb y 376pb.

Bandas correspondientes al alelo mutado V281L de 1366pb y 853pb.

(-/-) No portador de la mutación.

(+/-) Heterocigoto para la mutación.

(+/+) Homocigoto para la mutación.

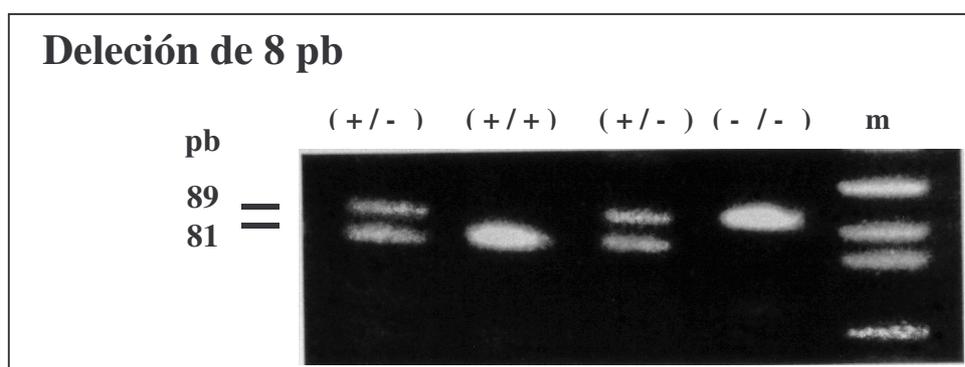
d: 100-pb DNA ladder (Gibco-BRL Life Technologies, Gaithersburg, MD).

La figura no muestra ejemplo de las bandas correspondientes a la mutación R339H de 1229pb y 990pb.

### 3.5.4.8. Mutación Exón 3 (delección 8-pb)

Directamente con el producto de PCR obtenido al amplificar con los cebadores específicos para esta mutación P9 y P10 (Fig. 3.3), realizar una electroforesis en gel de acrilamida al 10% utilizando la Acrilamida:Bisacrilamida [19:1]. Aplicar alto voltaje 8-30 W. Teñir el gel con Bromuro de Etidio.

Interpretación de resultados:



Banda correspondiente al alelo normal de 89pb.

Banda correspondiente al alelo mutado de 81pb.

(- / -) No portador de la mutación.

(+ / -) Heterocigoto para la mutación.

(+ / +) Homocigoto para la mutación.

m: DNA marker V (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany).

## 3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los cálculos estadísticos para la función hormonal, se han realizado por el test no paramétrico de Mann-Whitney<sup>173</sup>, considerando que el resultado era valorable cuando  $p < 0,05$  y el coeficiente de correlación de Pearson.

Los valores de significación estadística entre la distribución de los antígenos HLA en los diferentes grupos, se han valorado por el test de Chi cuadrado con la corrección de Yates cuando fue preciso, por el tamaño de la muestra, y el método de Woolf-Haldane.

El riesgo relativo (R.R.) (número de veces que el riesgo de la enfermedad es mayor en individuos con un antígeno respecto a los que no lo poseen), se ha calculado como el producto del número de pacientes portadores del antígeno y grupo control sin el marcador, dividido por el producto del número de pacientes sin el marcador y el grupo control con el antígeno<sup>174</sup>.



## **4. RESULTADOS**



#### 4.1. DATOS CLÍNICOS DE LOS PACIENTES

En la tabla IV.I. se detallan los signos clínicos presentes en nuestra serie de pacientes.

Los trece pacientes diagnosticados de forma “pérdida salina” (SW) (9♂/4♀), con una edad media de diagnóstico de 42 días  $\pm$  13 días ( $\bar{x} \pm \text{sem}$ ), desarrollaron todos ellos un cuadro de pérdida de sal y deshidratación, precisando una vez compensados, del tratamiento con hidrocortisona y 9 $\alpha$ -fluorhidrocortisona. Las cuatro niñas incluidas en este grupo, presentaban una virilización neonatal de sus genitales externos (30,77%), que oscilaba entre los tipos III y V de Prader. En dos niños, además, se observó hiperpigmentación escrotal (15,38%).

**Tabla IV. I:** Signos clínicos más característicos presentes en los tres grupos de pacientes.

	SW (n=13)	SV (n=5)	NC (n=53)
EDAD DIAGNOSTICO (media $\pm$ sem)	42 días $\pm$ 13 días	2 años $\pm$ 5 meses	8 años $\pm$ 6 meses
SEXO	9 ♂ / 4 ♀	4 ♂ / 1 ♀	15 ♂ / 38 ♀
PERDIDA SALINA	13 (100%)	—	—
VIRILIZACION NEONATAL	4 (30,77%)	—	—
VIRILIZACION TARDIA	—	1 (20%)	—
HIPERPIGMENTACION	2 (15,38%)	2 (40%)	—
POLIDIPSIA / POLIURIA	—	2 (40%)	—
EDAD OSEA ACELERADA	—	1 (20%)	—
PUBARQUIA	—	1 (20%)	34 (64,15%)
HIRSUTISMO	—	—	8 (15,09%)
PUBERTAD PRECOZ	—	—	3 (5,66%)
TALLA BAJA / TALLA ALTA	—	—	2 (3,77%)
ACNE	—	—	1 (1,88%)
GINECOMASTIA	—	—	1 (1,88%)

SW: Forma clásica con pérdida salina; SV: Forma virilizante simple; NC: Forma no clásica.

En el grupo de virilizantes simples (SV), los cinco pacientes (4♂/1♀) se diagnosticaron en la infancia temprana (2 años  $\pm$  5 meses ( $\bar{x} \pm \text{sem}$ )). Como signos clínicos más característicos, los niños presentaron escroto pigmentado (40%), polidipsia/poliuria (40%) y pubarquia (20%). En la única niña, existía una hipertrofia de clítoris manifiesta. En todos ellos, además, la maduración ósea sobrepasaba el límite superior de la normalidad de las curvas de referencia. El tratamiento con hidrocortisona, ha sido suficiente para controlar su evolución posterior.

En cincuenta y tres casos (15♂/38♀), se estableció el diagnóstico de la forma no clásica (NC), al consultar los pacientes a partir de los tres años de edad (8 años  $\pm$  6 meses ( $\bar{x} \pm \text{sem}$ )) por diferentes motivos, que iban desde una pubarquia de aparición precoz (64,15%) no valorada anteriormente, hirsutismo (15,09%), pubertad precoz (5,66%), talla baja, acné, etc. De las 38 niñas, ninguna presentaba hipertrofia de clítoris o virilización de sus genitales externos. Como en el caso anterior, sólo con hidrocortisona fueron bien controladas.

De todo ello se puede asegurar que, gracias a la revisión efectuada de los síntomas o signos clínicos de los pacientes motivo de estudio, la forma clínica del déficit en 21-hidroxilasa asignada a cada uno de ellos es la correcta. Lo que permitirá realizar, a continuación, un análisis real de los resultados obtenidos en cada grupo de pacientes considerado.

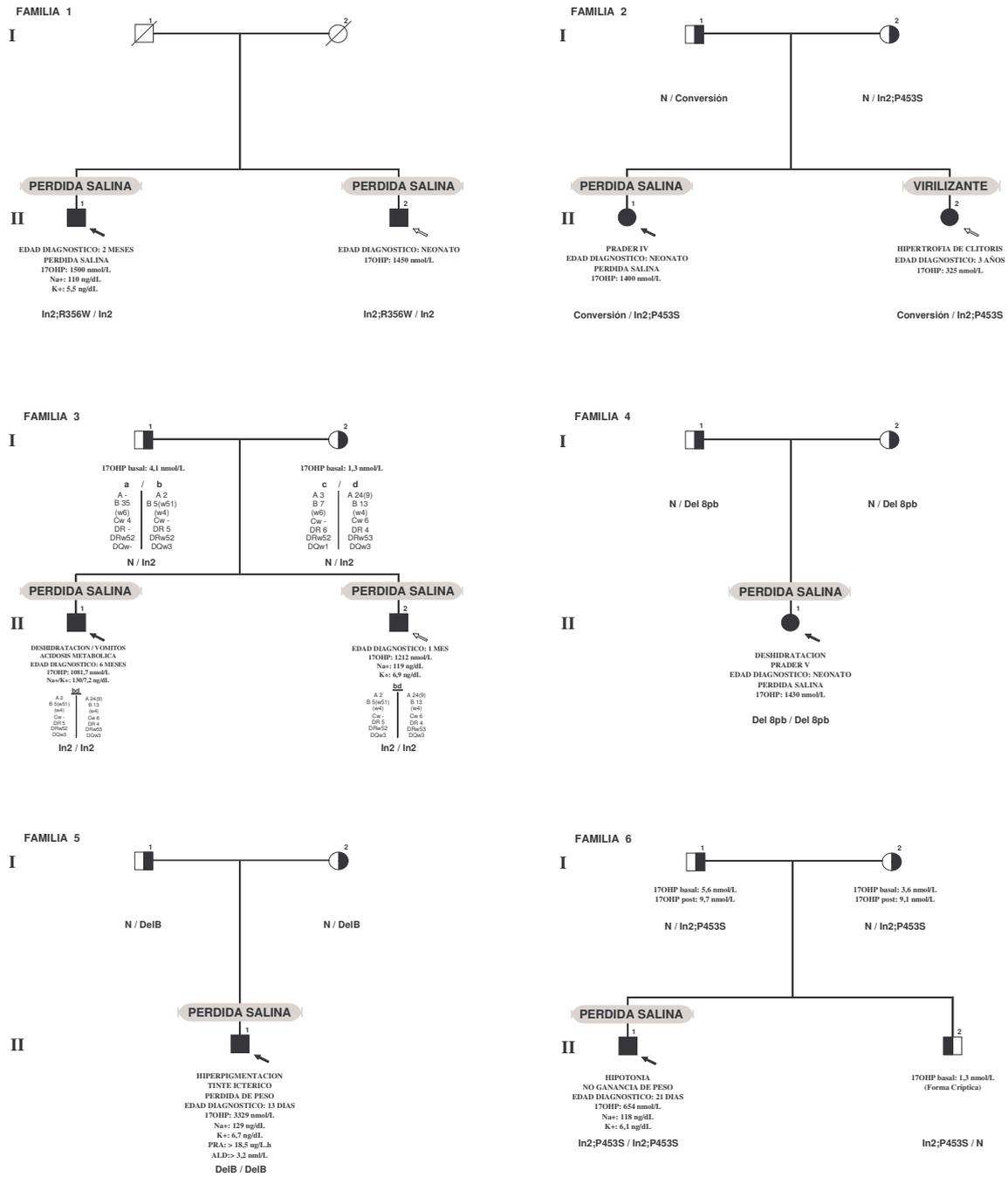
## **4.2. ÁRBOLES GENEALÓGICOS**

Antes de la exposición y análisis estadístico de los resultados obtenidos en este estudio, tanto de las concentraciones séricas de 17-OHP basal y post estimulación con ACTH, como de la distribución de los antígenos HLA y análisis genético molecular del gen 21-hidroxilasa, es importante efectuar una breve presentación de los árboles familiares, ya que facilitarán la comprensión de éstos.

Han colaborado en el estudio 53 familias de la población de Cataluña (106 cromosomas no emparentados), que representan un total de 71 pacientes diagnosticados de Hiperplasia Suprarrenal Congénita por déficit de la enzima 21-hidroxilasa, de los cuales trece presentan la forma “pérdida salina” (SW); cinco la forma virilizante simple (SV) y cincuenta y tres la forma no clásica (NC).

Los árboles genealógicos de las familias estudiadas con al menos un hijo afecto de déficit en 21-hidroxilasa con forma SW se recogen en la figura 4.1.

Observamos que de las once familias analizadas, siete tenían un solo hijo diagnosticado de forma SW (familias 4; 5; 6; 7; 8; 9 y 11); dos tenían dos hijos afectados de forma SW (familias 1 y 3) en ambos casos de sexo masculino y otras dos familias tenían un primer hijo afecto de forma SW y un segundo hijo afecto de forma virilizante simple (SV) (familia 2, ambos de sexo femenino y familia 10, uno de sexo femenino y afecto de la forma SW, mientras que el otro, de sexo masculino y forma SV).



**Figura 4. 1:** Pedigrees de las familias 1 – 11 con forma pérdida salina del déficit en 21-hidroxilasa.

■●, individuos homocigotos del déficit. □○, individuos portadores heterocigotos del déficit.

⊠/⊙, progenitores fallecidos. ➔, caso índice. ⇨, hermanos afectados del caso índice.

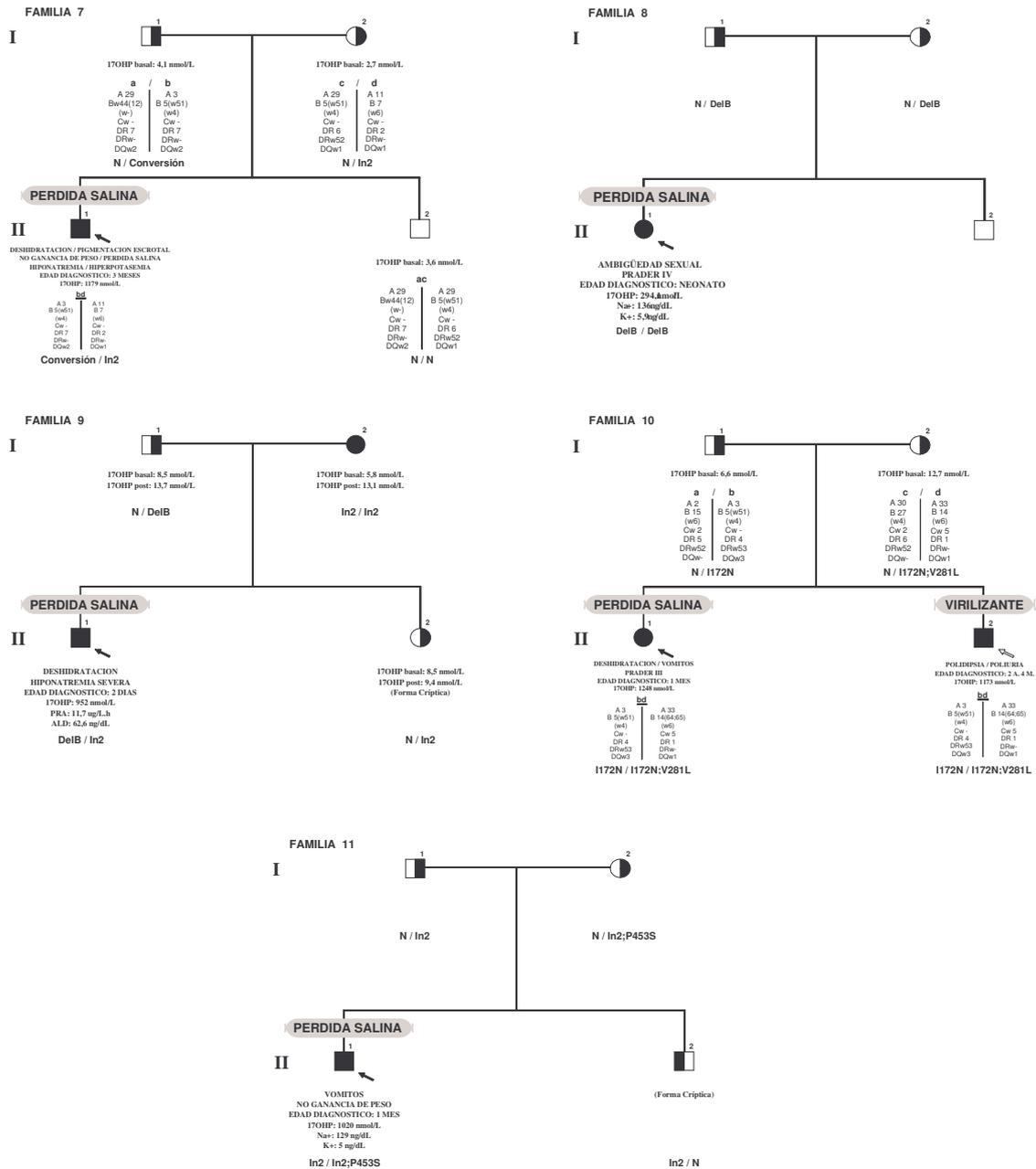
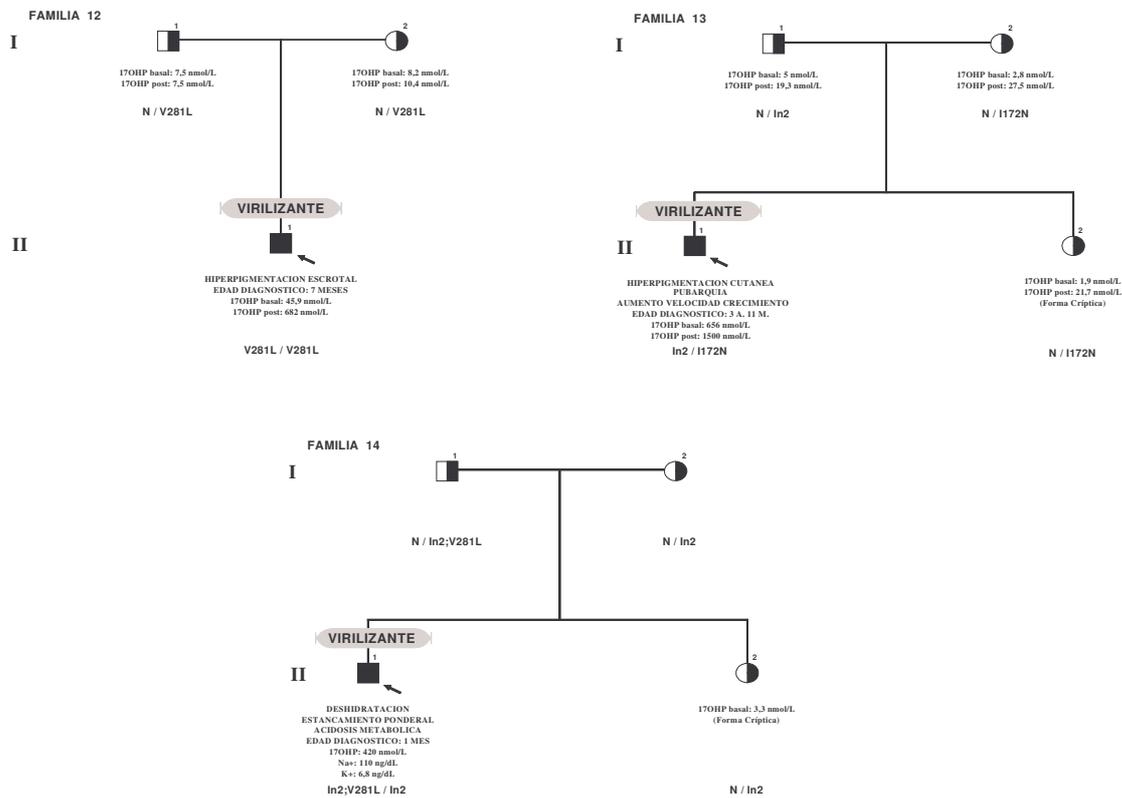


Figura 4. 1: (continuación)

Excepto en la familia 1, en que ambos padres habían fallecido, en el resto de las familias los dos padres colaboraron en el estudio (20 progenitores), no estando ninguno de ellos clínicamente afecto; al mismo tiempo, también participaron cuatro hermanos sanos de estos pacientes (familias 6; 7; 9 y 11).

En la figura 4.2. se muestran los árboles genealógicos de las tres familias estudiadas con un único hijo diagnosticado de déficit en 21-hidroxilasa con forma virilizante simple (SV) (familias 12; 13 y 14). Seis progenitores y dos hermanos clínicamente no afectados, también se incluyeron en el estudio.



**Figura 4. 2:** Pedigrees de las familias 12 – 14 con forma virilizante simple del déficit en 21-hidroxilasa.

■ ●, individuos homocigotos del déficit. □ ○, individuos portadores heterocigotos del déficit.

➔, caso índice. ⇨, hermanos afectados del caso índice.

Por lo que respecta a las familias estudiadas de los 53 afectados de forma no clásica (NC), la figura 4. 3. recoge los árboles genealógicos de todas ellas.

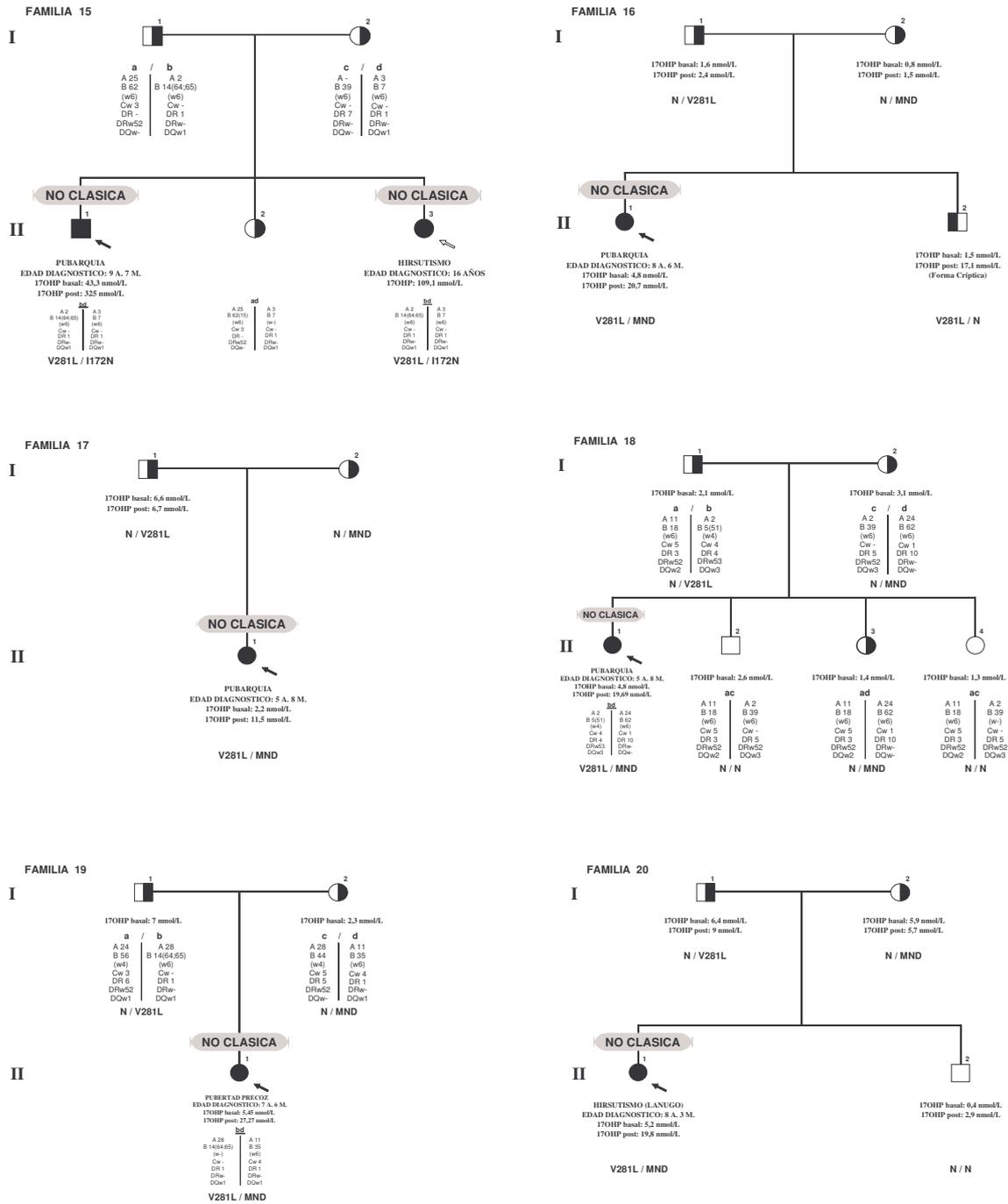


Figura 4. 3: Pedigrees de las familias 15 – 53 con forma no clásica del déficit en 21-hidroxilasa.

■●, individuos homocigotos del déficit. □ ○, individuos portadores heterocigotos del déficit.

➔, caso índice. ⇨, hermanos afectados del caso índice.

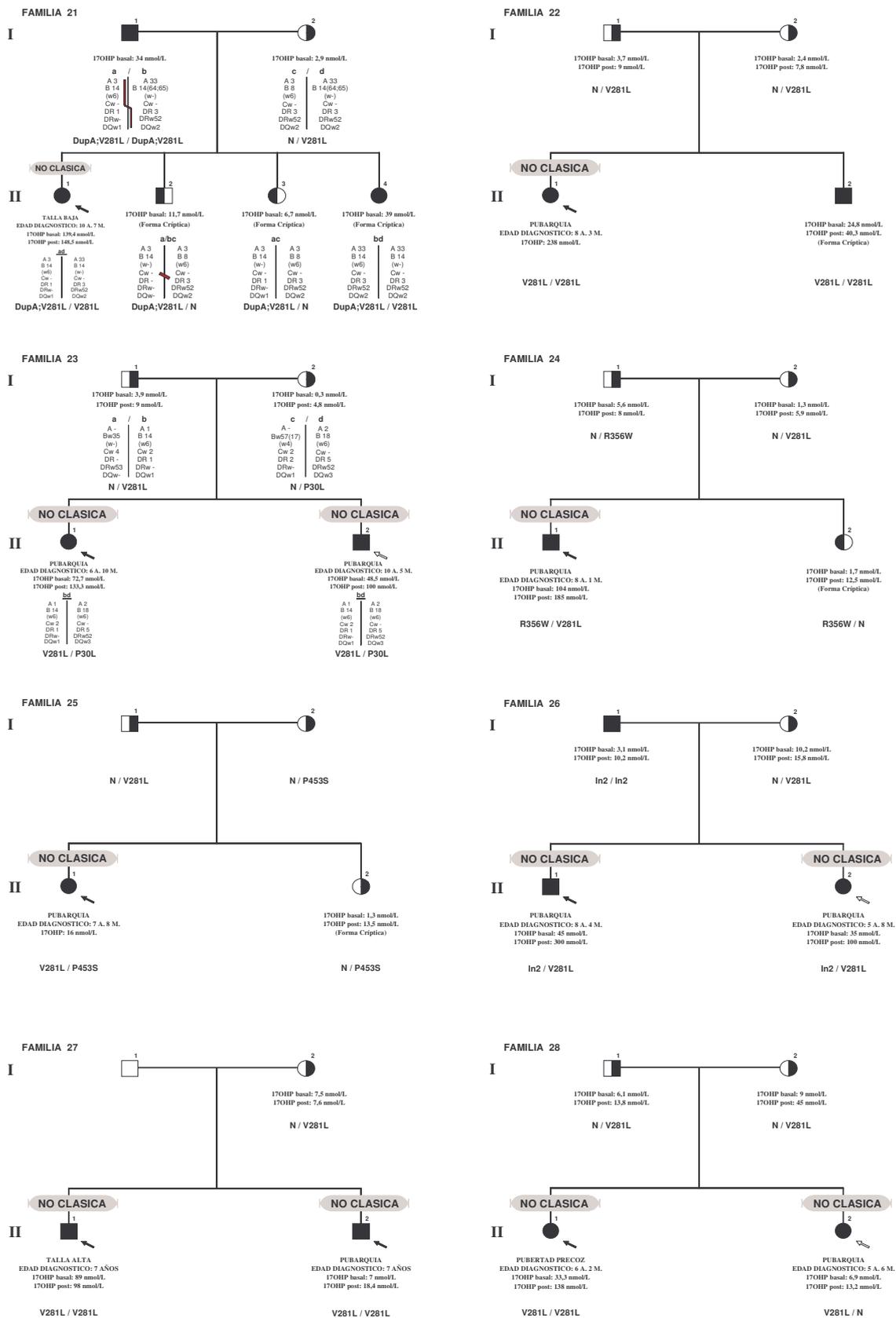


Figura 4. 3: (continuación)

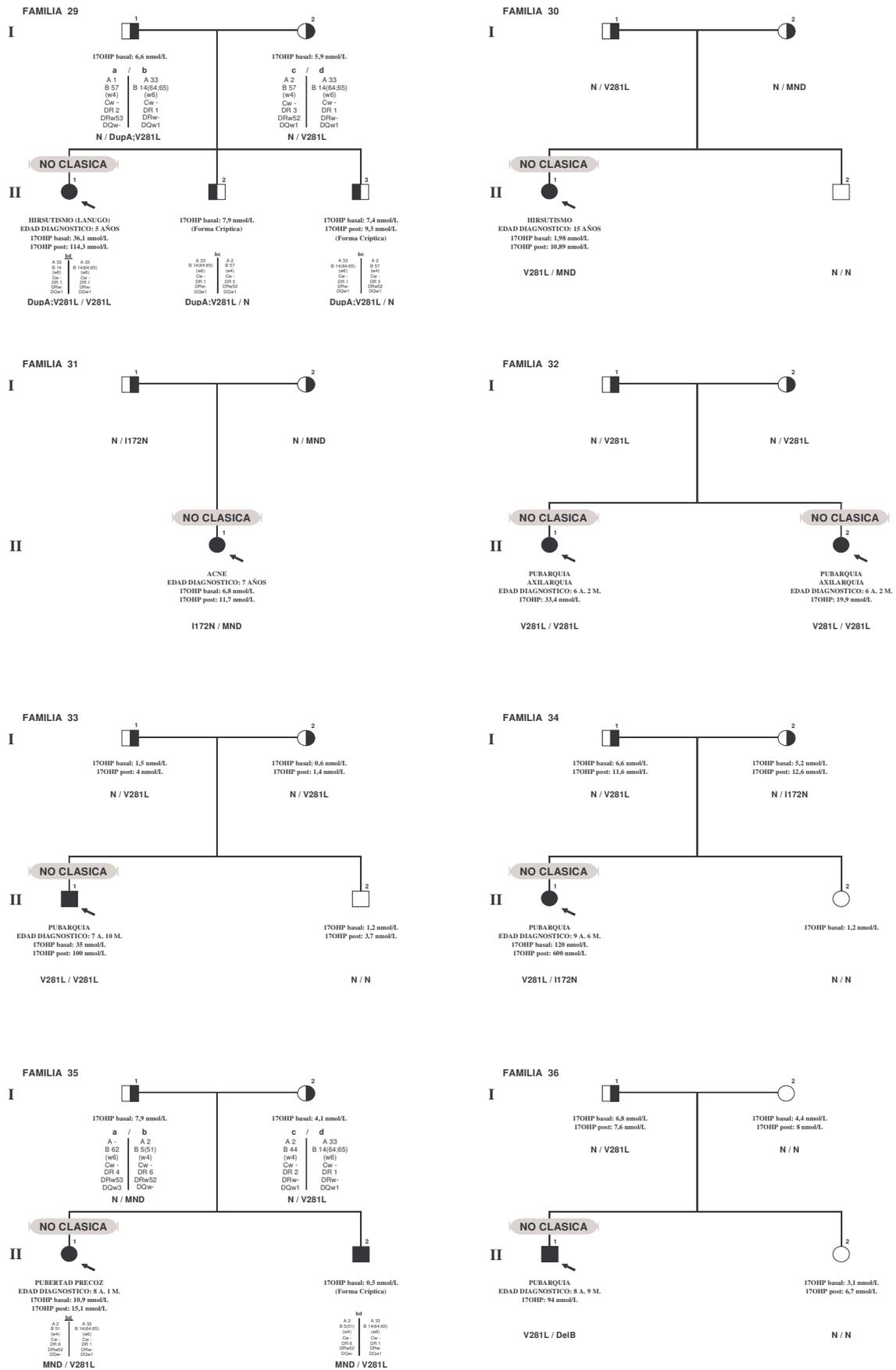


Figura 4. 3: (continuación)

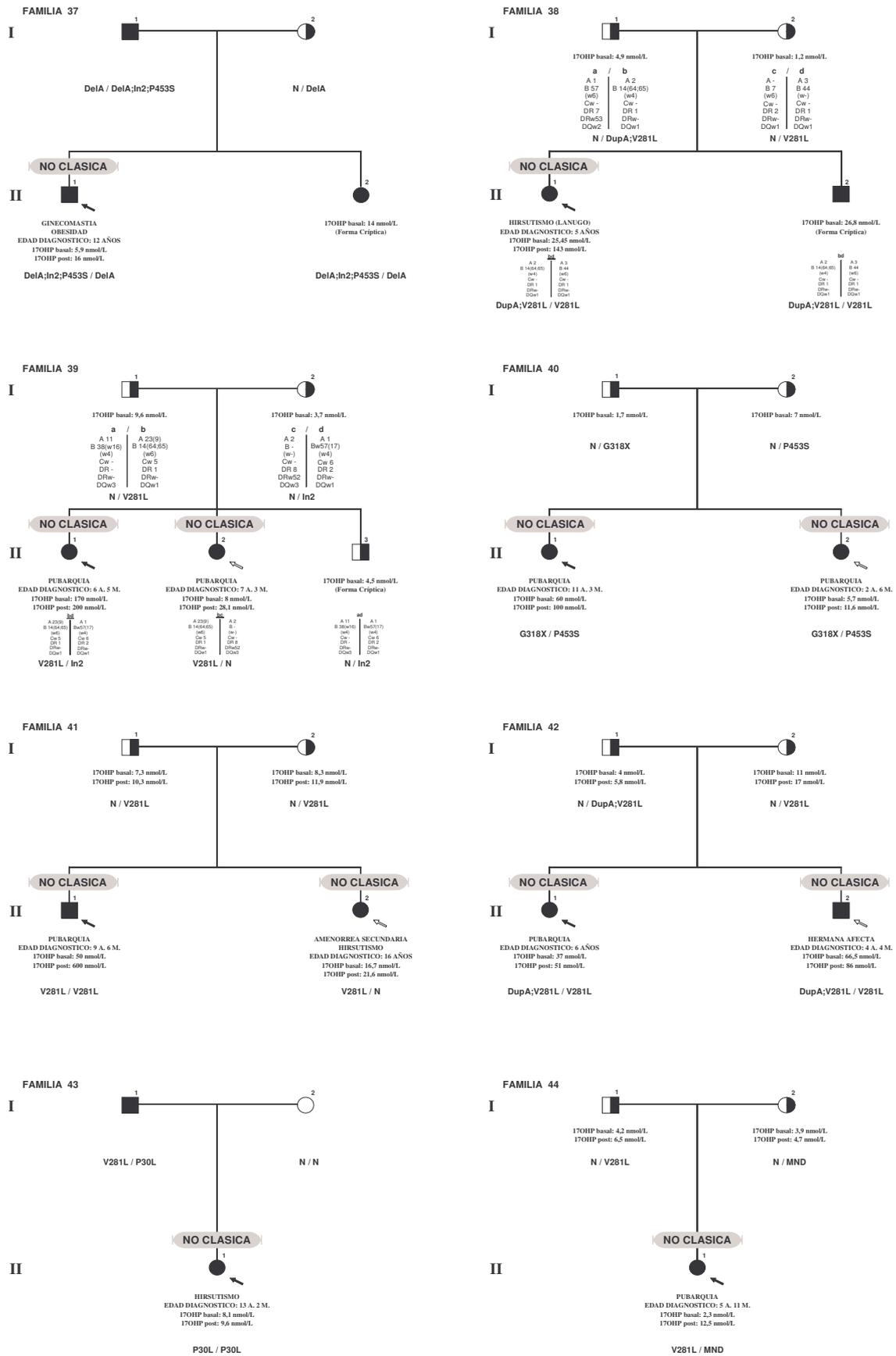


Figura 4. 3: (continuación)

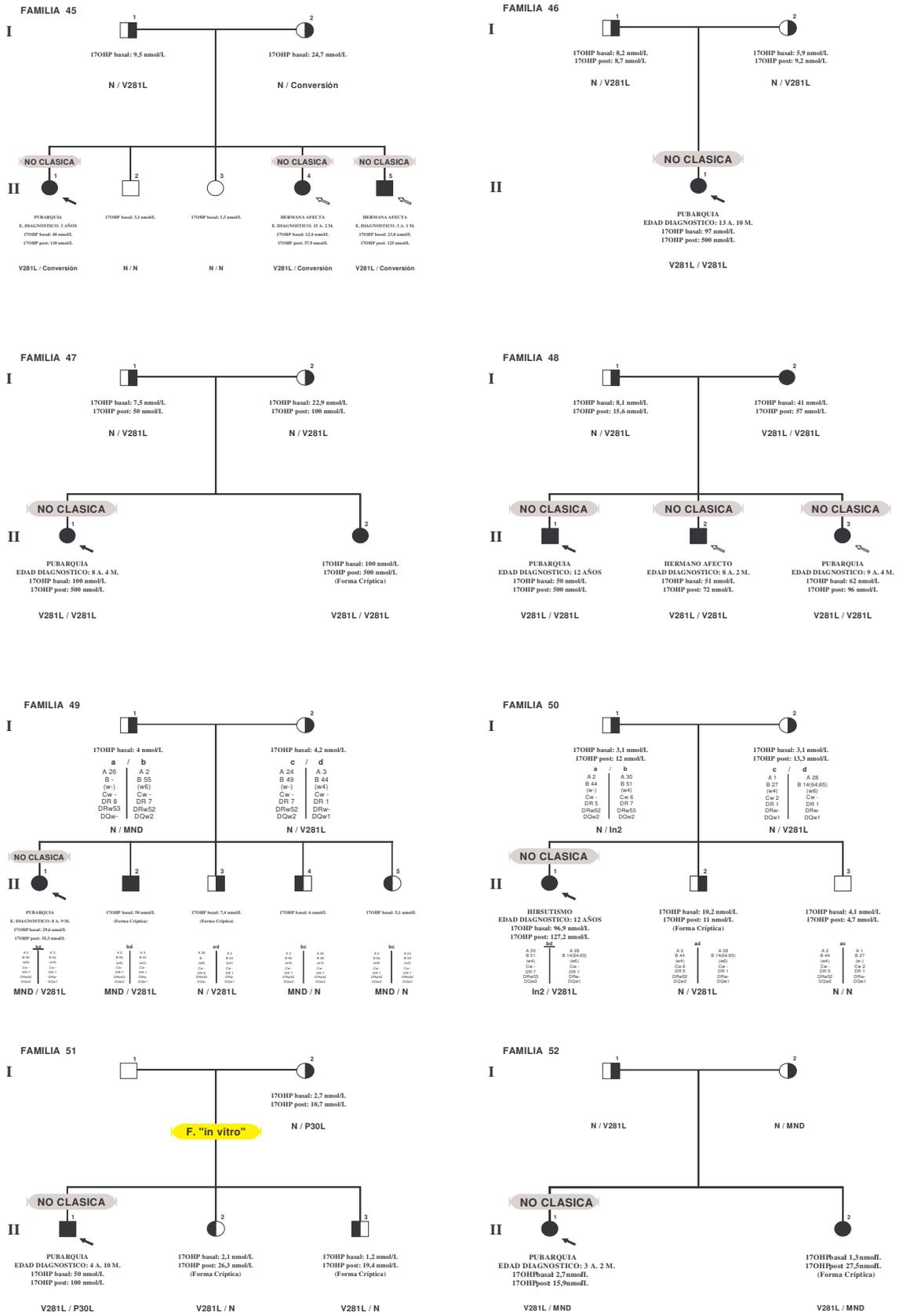
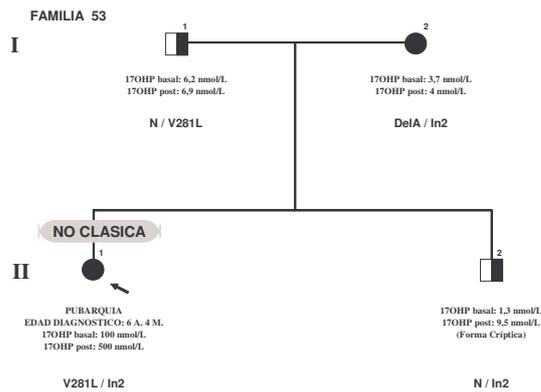


Figura 4. 3: (continuación)



**Figura 4. 3:** (continuación)

Participaron en el estudio 39 familias de la forma NC, de las cuales 27 solo tenían un hijo afecto (familias 16; 17; 18; 19; 20; 21; 22; 24; 25; 29; 30; 31; 33; 34; 35; 36; 37; 38; 43; 44; 46; 47; 49; 50; 51; 52 y 53); 10 tenían dos afectos (familias 15; 23; 26; 27; 28; 32; 39; 40; 41 y 42) y dos familias tenían tres hijos afectos (familias 45 y 48). Las familias 27 y 32 presentan, cada una de ellas, dos hijos gemelos afectos NC, de sexo masculino y femenino respectivamente.

Al mismo tiempo, 35 hermanos sanos de estos pacientes y 76 progenitores clínicamente no afectados fueron estudiados. Señalar que en las familias 27 y 51, únicamente la madre colaboró.

Finalmente resaltar, que el número total de individuos incluidos en el estudio fue de 214.

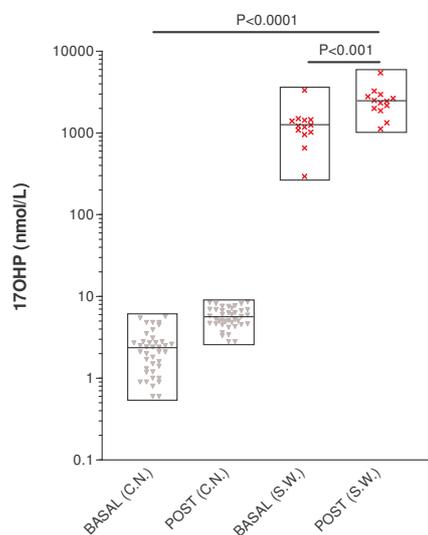
### 4.3. ANÁLISIS HORMONAL

Las concentraciones séricas, basales y post estimulación con ACTH, de 17-hidroxiprogesterona (17-OHP) obtenidas en los pacientes y familiares, se valorarán a continuación por grupos diferenciados (pacientes, progenitores y hermanos no afectados) y también conjuntamente. Finalmente la representación gráfica de todas estas parejas de resultados hormonales, dará lugar a la formación de un Nomograma de referencia de nuestra población estudiada.

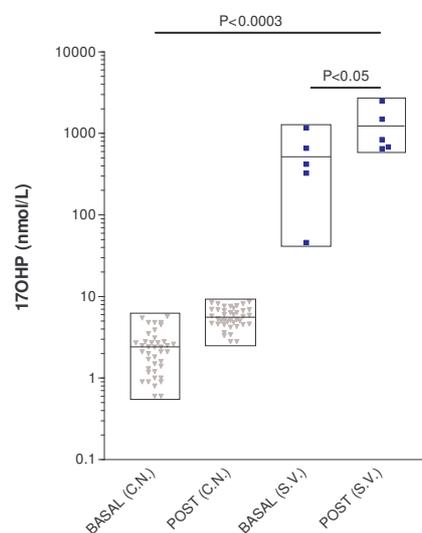
#### 4.3.1. Pacientes con déficit de 21-hidroxilasa.

En los pacientes con forma SW, las tasas séricas basales de 17-OHP fueron de  $1288,4 \pm 194,5$  nmol/L ( $\bar{x} \pm \text{sem}$ ) y post estímulo de  $2524,9 \pm 294,1$  nmol/L ( $\bar{x} \pm \text{sem}$ ), significativamente diferentes entre sí ( $p < 0,001$ ) y con respecto al grupo control ( $p < 0,0001$ ) (Fig. 4. 4.). Al mismo tiempo, entre los valores basales y post de 17-OHP de

estos pacientes, encontramos una correlación ( $r = 0,9832$ ) estadísticamente significativa ( $p < 0,0001$ ).



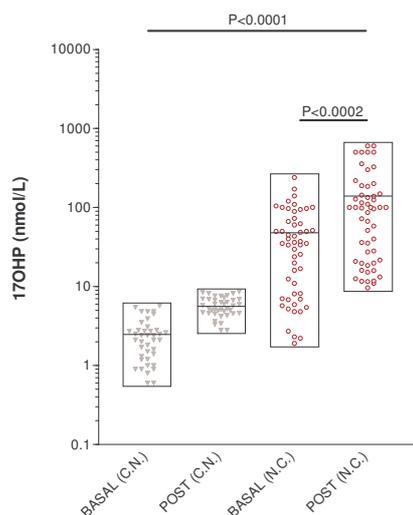
**Figura 4. 4:**Concentraciones séricas de 17-OHP basales y post estimulación con ACTH, en los pacientes con forma S.W. y grupo control (C.N.). La línea horizontal situada en el interior de cada grupo representa la media, enmarcada entre el valor máximo y mínimo.



**Figura 4. 5:**Concentraciones séricas de 17-OHP basales y post estimulación con ACTH, en los pacientes con forma S.V. y grupo control (C.N.). La línea horizontal situada en el interior de cada grupo representa la media, enmarcada entre el valor máximo y mínimo.

Por lo que respecta a los pacientes con forma SV, los valores séricos basales y post estímulo de 17-OHP encontrados, fueron de  $523,9 \pm 189,4$  nmol/L ( $\bar{x} \pm \text{sem}$ ) y  $1234,4 \pm 351,7$  nmol/L ( $\bar{x} \pm \text{sem}$ ) respectivamente. Estos valores, fueron estadísticamente ( $p < 0,05$ ) diferentes entre sí y también ( $p < 0,0003$ ) respecto a los encontrados en el grupo control (Fig. 4. 5.). La correlación hallada entre los valores basales y post en este grupo de pacientes fue de  $r = 0,9589$ , siendo también estadísticamente significativa ( $p < 0,009$ ).

El grupo de pacientes con forma NC, presentó unas concentraciones basales de 17-OHP de  $47,9 \pm 6,6$  nmol/L ( $\bar{x} \pm \text{sem}$ ) y de  $140,3 \pm 22,4$  nmol/L ( $\bar{x} \pm \text{sem}$ ) post estímulo con ACTH, estadísticamente ( $p < 0,0002$ ) diferentes entre sí, y con un coeficiente de correlación ( $r = 0,5931$ ) estadísticamente significativo ( $p < 0,0001$ ). Además, estos valores fueron significativamente superiores ( $p < 0,0001$ ) a los hallados en el grupo control (Fig. 4. 6.).



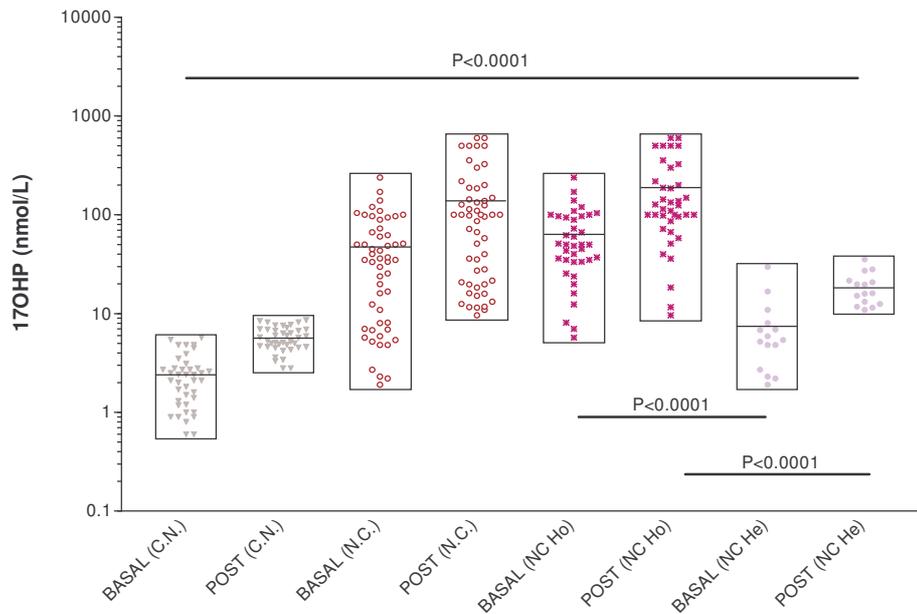
**Figura 4. 6:** Concentraciones séricas de 17-OHP basales y post estimulación con ACTH, en los pacientes con forma N.C. y grupo control (C.N.). La línea horizontal situada en el interior de cada grupo representa la media, enmarcada entre el valor máximo y mínimo.

Si observamos detenidamente las tasas basales y post estimulación de 17-OHP obtenidas en estos pacientes con forma NC, encontramos una gran dispersión de valores que dificulta su interpretación. Esta dispersión la conseguimos reducir, al agrupar dichos valores en función de si estos pacientes presentan alteraciones génicas en uno de sus cromosomas o en los dos, independientemente del tipo de lesión detectada.

De esta manera, tenemos que de los 53 pacientes con forma NC analizados anteriormente de forma conjunta, 38 presentaron lesión del gen 21-OH en ambos cromosomas, idéntica o no, formando el grupo de pacientes con forma NC *homocigotos* y en los 15 restantes la lesión sólo se detectó en uno de los cromosomas, dando lugar al grupo de pacientes con forma NC *heterocigotos*.

Al realizar el análisis hormonal en estos dos nuevos grupos observamos que los valores basales y post estímulo de 17-OHP en los pacientes con forma NC *homocigotos* fueron de  $63,8 \pm 7,8$  nmol/L ( $\bar{x} \pm \text{sem}$ ) y de  $188,2 \pm 27,7$  nmol/L ( $\bar{x} \pm \text{sem}$ ), mientras que en los pacientes con forma NC *heterocigotos* fueron de  $7,6 \pm 1,8$  nmol/L ( $\bar{x} \pm \text{sem}$ ) y de  $18,6 \pm 1,8$  nmol/L ( $\bar{x} \pm \text{sem}$ ), todos ellos estadísticamente diferentes entre sí ( $p < 0,0001$  y  $p < 0,0002$  respectivamente); entre los dos grupos de pacientes NC considerados ( $p < 0,0001$ ) y con respecto al grupo control ( $p < 0,0001$ ) (Fig. 4. 7.).

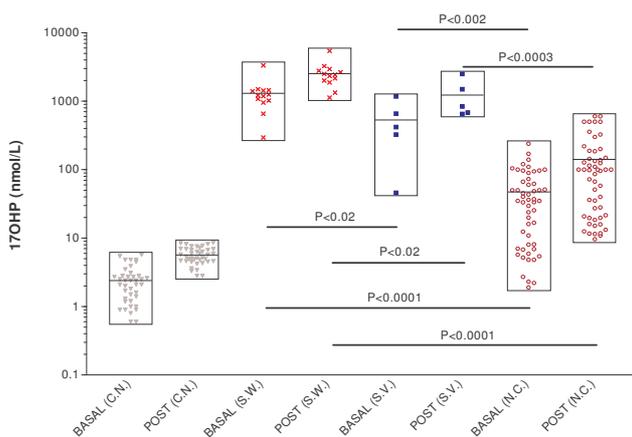
Además, los coeficientes de correlación entre los valores basales y post hallados en cada uno de los grupos anteriormente citados, fueron también estadísticamente significativos (NC *homocigotos*  $r = 0,4604$ ;  $p < 0,004$  y NC *heterocigotos*  $r = 0,6944$ ;  $p < 0,004$ ).



**Figura 4. 7:**Concentraciones séricas de 17-OHP basales y post estimulación con ACTH, en los pacientes con forma N.C.; N.C. *homozigotos* (N.C. Ho); N.C. *heterozigotos* (N.C. He) y grupo control (C.N.). La línea horizontal situada en el interior de cada grupo representa la media, enmarcada entre el valor máximo y mínimo.

Se constata claramente, como ya era de esperar, que los valores de 17-OHP que presentaron los pacientes con forma NC *homozigotos* eran muy superiores a los pacientes NC *heterozigotos*. Esto ocurre, como consecuencia de una menor actividad de la enzima 21-hidroxilasa en los primeros, al presentar lesiones génicas en sus dos cromosomas respecto a los segundos, en los que sólo encontramos alteración en uno de sus cromosomas.

En el Nomograma de referencia, los pacientes con forma NC aparecerán



**Figura 4. 8:**Concentraciones séricas de 17-OHP basales y post estimulación con ACTH, en los pacientes con forma S.W.; S.V.; N.C. y grupo control (C.N.). La línea horizontal situada en el interior de cada grupo representa la media, enmarcada entre el valor máximo y mínimo.

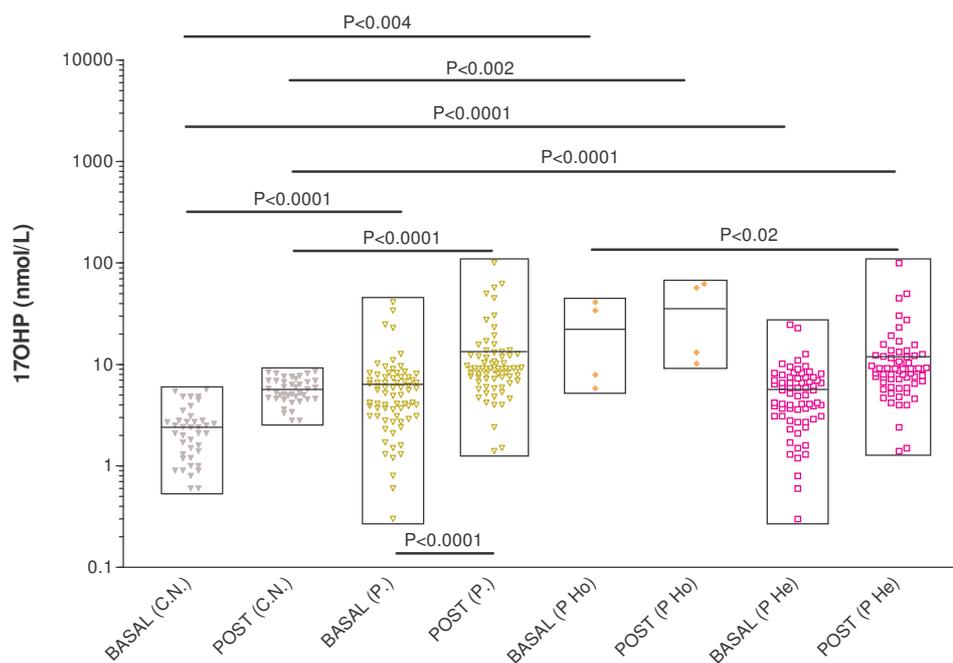
subdivididos como ya hemos explicado anteriormente, ya que de esta manera conseguimos definir mucho mejor a este complejo grupo de pacientes. Finalmente, resaltar que se encuentran diferencias estadísticamente significativas, al comparar los valores séricos de 17-OHP basales y post estímulo entre los tres grupos clínicos

considerados anteriormente (Fig. 4. 8.).

#### 4.3.2. Progenitores

Del total de progenitores incluidos en el estudio, únicamente 72 accedieron a que se les practicase el test de ACTH. No se observó diferencias en los valores de 17-OHP de estos, fuera cual fuese el grupo clínico al que pertenecen sus hijos afectados, de ahí, que el análisis hormonal de dichos progenitores se realice globalmente.

Los valores séricos basales de 17-OHP encontrados fueron de  $6,5 \pm 0,7$  nmol/L ( $\bar{x} \pm \text{sem}$ ) y post estímulo de  $13,2 \pm 1,8$  nmol/L ( $\bar{x} \pm \text{sem}$ ), significativamente diferentes entre sí ( $p < 0,0001$ ) y con respecto al grupo control ( $p < 0,0001$ ). La correlación hallada entre estos valores basales y post fue de  $r = 0,7524$ , estadísticamente significativa ( $p < 0,0001$ ).



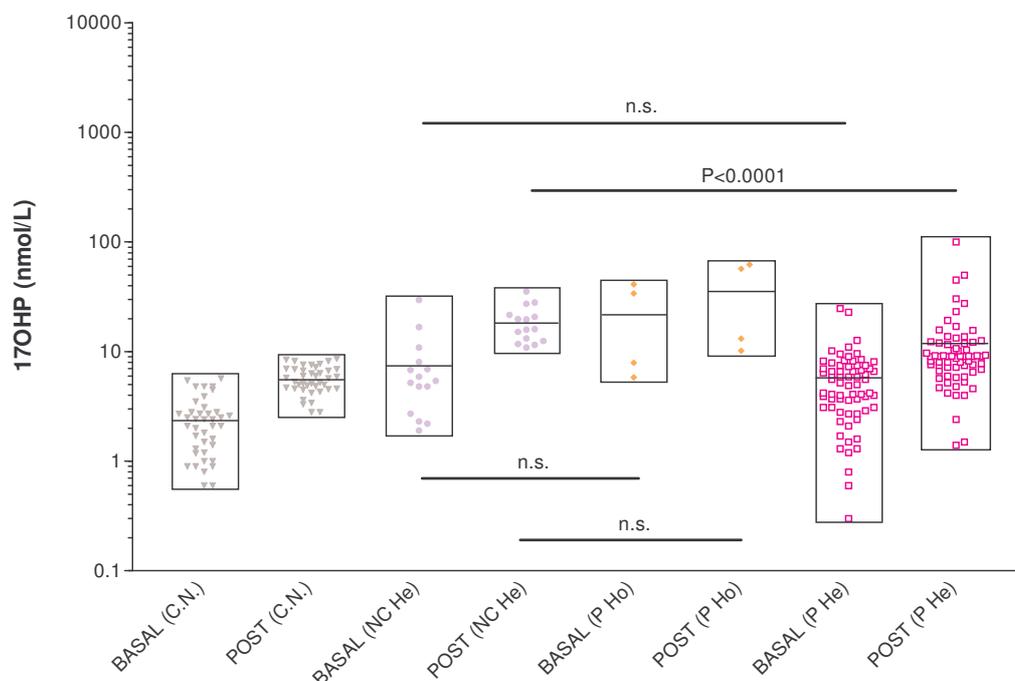
**Figura 4. 9:** Concentraciones séricas de 17-OHP basales y post estimulación con ACTH, en los progenitores (P.); P. *homozigotos* (P. Ho); P. *heterozigotos* (P. He) y grupo control (C.N.). La línea horizontal situada en el interior de cada grupo representa la media, enmarcada entre el valor máximo y mínimo.

Como se ha explicado, al tratarse de una enfermedad hereditaria autosómica recesiva, ambos padres deben de ser portadores obligados (*heterozigotos*) del déficit en 21-hidroxilasa, excepto en los casos, poco frecuentes, de mutaciones *de novo*. Por lo

que, si procedemos a continuación a realizar el análisis de los valores de 17-OHP en nuestros progenitores según sean *heterocigotos* u *homocigotos*, tal como se realizó en el grupo de pacientes con forma NC, observamos que los progenitores *homocigotos* presentaban unos valores basales y post estímulo ( $20,9 \pm 9,6$  nmol/L y  $35,5 \pm 13,8$  nmol/L ( $\bar{x} \pm \text{sem}$ )) significativamente superiores ( $p < 0,02$ ) a los encontrados en los progenitores *heterocigotos* ( $5,6 \pm 0,5$  nmol/L y  $11,9 \pm 1,6$  nmol/L ( $\bar{x} \pm \text{sem}$ )). Siendo, además, todos ellos estadísticamente diferentes a los observados en el grupo control (Fig. 4. 9.).

A diferencia de lo que sería de esperar, los progenitores *homocigotos* con mutaciones severas en ambos cromosomas, no presentaban valores de 17-OHP diferentes de aquellos que eran portadores de mutaciones menos severas.

Cuando comparamos los valores séricos de 17-OHP basales y post estímulo, descritos anteriormente, de los progenitores *homocigotos* y *heterocigotos* con los obtenidos en cada grupo de pacientes considerados, encontramos en todos los casos diferencias significativas, excepto con el grupo de pacientes con forma NC *heterocigotos*. Como se muestra en la figura 4. 10., los valores de 17-OHP en estos tres grupos de individuos son tan parecidos que no son característicos, dificultándonos su interpretación.

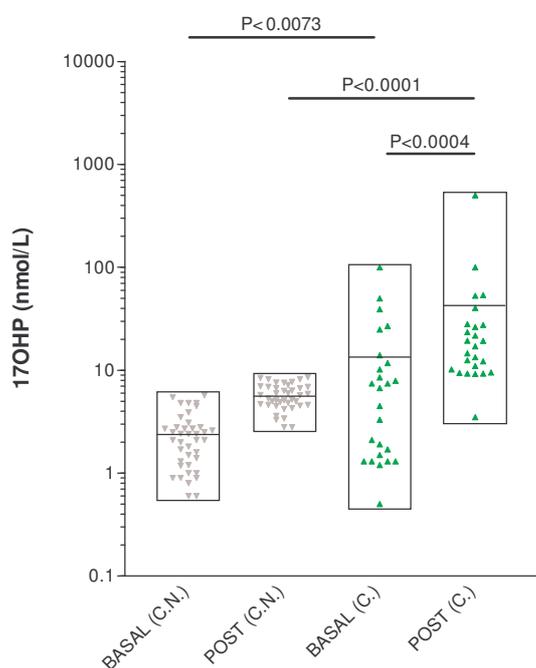


**Figura 4. 10:** Concentraciones séricas de 17-OHP basales y post estimulación con ACTH, en los pacientes con forma N.C. He.; P. Ho.; P. He. y grupo control (C.N.). La línea horizontal situada en el interior de cada grupo representa la media, enmarcada entre el valor máximo y mínimo.

### 4.3.3. Hermanos no afectados de los pacientes.

La determinación de las tasas de 17-OHP y el estudio genético realizado en los 40 hermanos clínicamente no afectados de nuestros pacientes, dió como resultado que 14 de ellos no presentaban alteración alguna, eran pues, individuos *sanos*. Mientras que los otros 26 eran formas crípticas, es decir, sujetos asintomáticos a pesar de la existencia de un cierto grado de hiperandrogenia biológica y una afección del gen de la 21-hidroxilasa.

Las tasas de 17-OHP de los hermanos *sanos* se encontraban todas dentro de la normalidad. Por el contrario, las formas crípticas presentaban valores basales de 17-OHP de  $13,4 \pm 4,3$  nmol/L ( $\bar{x} \pm \text{sem}$ ) inferiores significativamente ( $p < 0,0004$ ) a los valores post estímulo que fueron de  $42,1 \pm 19,5$  nmol/L ( $\bar{x} \pm \text{sem}$ ) y al mismo tiempo ambos estadísticamente diferentes con respecto a los del grupo control ( $p < 0,0073$  y  $p < 0,0001$  respectivamente) (Fig. 4. 11.). Encontramos una correlación ( $r = 0,9097$ ) estadísticamente significativa ( $p < 0,0001$ ) entre estos valores de 17-OHP basales y post el estímulo con ACTH.

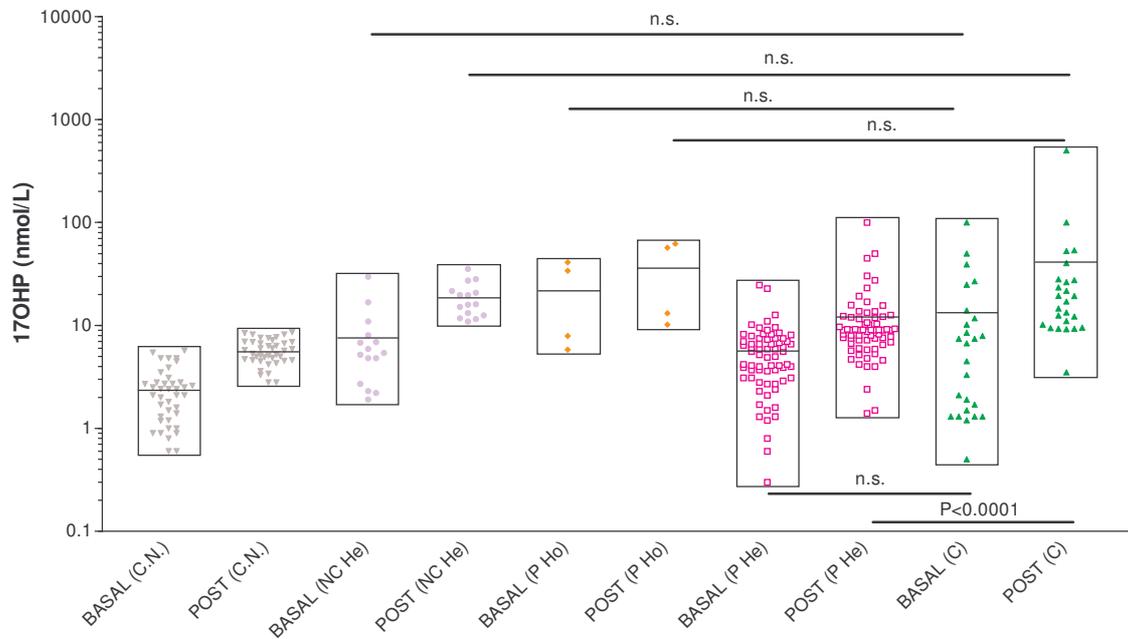


**Figura 4. 11:**Concentraciones séricas de 17-OHP basales y post estimulación con ACTH, en las formas crípticas (C.) y grupo control (C.N.). La línea horizontal situada en el interior de cada grupo representa la media, enmarcada entre el valor máximo y mínimo.

No existen diferencias en los valores de 17-OHP de estas formas crípticas fuera cual fuese el grupo clínico al que pertenecen sus hermanos afectados.

Si comparamos los valores séricos basales y post estímulo de 17-OHP de las formas crípticas con los obtenidos en cada grupo de individuos considerados anteriormente, encontramos diferencias significativas en todos los casos, excepto con los grupos de pacientes con forma NC *heterocigotos*; progenitores *homocigotos* y

progenitores *heterozigotos* como se muestra en la figura 4. 12. En estos cuatro grupos los valores de 17-OHP son muy similares, distribuyéndose en la misma zona de la gráfica, de ahí que no sean suficientemente informativos para asignarlos a uno de estos grupos.



**Figura 4. 12:** Concentraciones séricas de 17-OHP basales y post estimulación con ACTH, en los pacientes con forma N.C. He.; P. Ho.; P. He.;C. y grupo control (C.N.). La línea horizontal situada en el interior de cada grupo representa la media, enmarcada entre el valor máximo y mínimo.

#### 4.3.4. Nomograma de referencia.

Para finalizar, las concentraciones séricas de 17-OHP basales respecto a las obtenidas 30 minutos tras el estímulo con ACTH de los individuos anteriormente descritos, son valoradas en un Nomograma (Fig. 4. 13.).

La interpretación de este, en general, se basa en el pico de respuesta de la 17-OHP. La utilización de una escala logarítmica, nos permite representar y diferenciar en una misma gráfica los resultados encontrados en todos los grupos de individuos considerados.

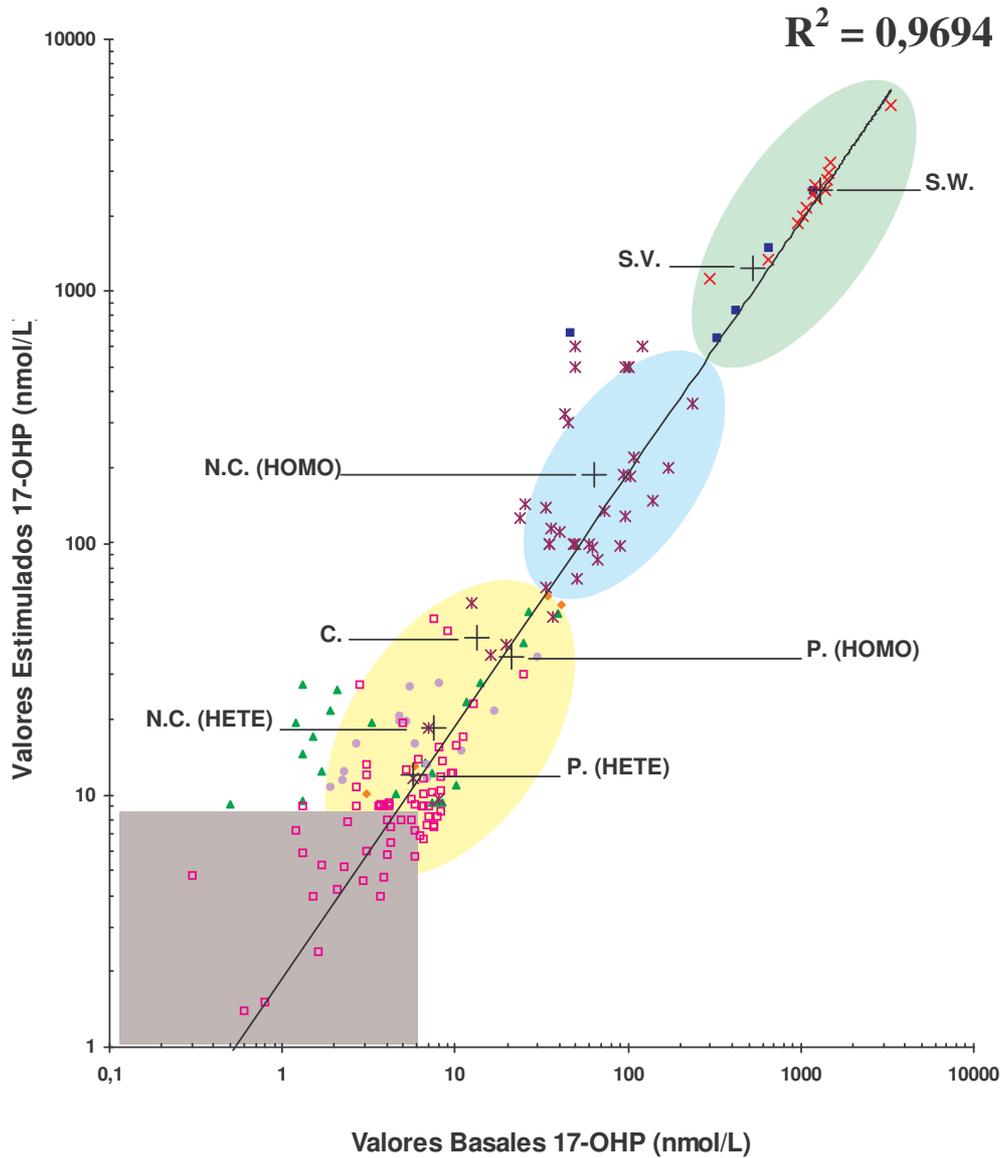
Hay que decir, que el grupo control utilizado para la formación de este Nomograma no estaba genéticamente estudiado, por lo que puede haber una combinación de *heterozigotos* y sujetos no afectados genéticamente.

Encontramos una correlación ( $r = 0,9845$ ) estadísticamente significativa ( $p < 0,0001$ ), entre los valores de 17-OHP basales y post estímulo.

Como se puede apreciar, las parejas de resultados hormonales, se distribuyen en grupos fácilmente diferenciables en una recta de regresión, con el siguiente orden descendente: en la parte superior tenemos los pacientes con forma clásica de déficit en 21-hidroxilasa, englobando los pacientes SW y SV, que presentan todos ellos concentraciones séricas basales de 17-OHP altas (superiores a 350 nmol/L), aunque su distribución, como podemos observar, no permite establecer una frontera franca entre estos dos subgrupos de pacientes; en la zona intermedia se encuentran los pacientes *homocigotos* para la forma NC de déficit en 21-hidroxilasa con concentraciones séricas post estímulo de 17-OHP moderadamente elevadas (superiores a 60 nmol/L); y por último, en la parte inferior, la más compleja y difícil de interpretar, observamos una distribución de valores entremezclada del resto de los grupos estudiados, es decir, de las formas crípticas, de los progenitores *homocigotos*, los pacientes *heterocigotos* para la forma NC y los progenitores *heterocigotos*, sin poder establecer áreas características de cada uno de ellos que faciliten su diagnóstico. Ahora bien, sí queda claro que tanto los pacientes *heterocigotos* para la forma NC, como los progenitores *homocigotos* y las formas crípticas, se encuentran fuera del área correspondiente al grupo control, presentando un espectro de concentraciones de 17-OHP post estímulo que abarca desde valores superiores a 9,1 nmol/L hasta 60 nmol/L, no superando ninguno de ellos este límite establecido. Por el contrario, los progenitores *heterocigotos* mayoritariamente muestran unos valores post estímulo de 17-OHP normales o poco aumentados (inferiores a 20 nmol/L) de ahí que observemos valores situados dentro del área de los controles normales y otros fuera, pero muy próximos a ella.

Es importante resaltar, que de todos los grupos representados en el Nomograma, únicamente los progenitores *heterocigotos* presentan individuos con un test de estimulación con ACTH normal aún siendo portadores de alguna alteración en el gen funcional CYP21B.

Constatar que a todos estos individuos localizados en la parte inferior del Nomograma, el diagnóstico no se hará correctamente, siempre y cuando no se realice una valoración conjunta de los datos clínicos obtenidos, del test de ACTH practicado y del análisis genético molecular del gen 21-hidroxilasa.



■ C.N.	■ S.V.
× S.W.	▲ C.
* N.C. (HOMO)	● N.C. (HETE)
◆ P. (HOMO)	□ P. (HETE)
+ MEDIAS	— Lineal (RECTA DE REGRESION)

**Figura 4. 13:** Nomograma con las concentraciones séricas de 17-OHP basales y post estimulación con ACTH, obtenidas en todos los grupos de individuos estudiados.

La distribución de respuestas a lo largo de la recta de regresión pone de manifiesto que en estos grupos hay un espectro de déficit enzimático. Los pacientes con forma clásica poseen el déficit más severo, los pacientes con la forma no clásica tienen

un déficit menos severo, mientras que los *heterocigotos*, tienen el mismo defecto suavizado, el cual es únicamente desenmascarado mediante estimulación con ACTH.

El Nomograma de 17-OHP nos proporciona un patrón hormonal para asignar la forma clínica del déficit en 21-hidroxilasa, es decir, pacientes cuyos valores hormonales caigan sobre la recta de regresión dentro de un grupo definido, serán asignados a este grupo, de ahí, que podremos utilizarlo como Nomograma de referencia de nuestra población.

#### **4.4. ANTÍGENOS DEL SISTEMA HLA**

El tipaje de los antígenos HLA correspondientes a las moléculas de clase I (locus A, B y C) y clase II (locus DR y DQ) mediante la técnica de microlinfocitotoxicidad, se determinó en 14 de las familias incluidas en el estudio escogidas al azar, de las cuales, tres eran formas clásicas con o sin pérdida de sal (Fig. 4. 1: familias 3, 7 y 10) y once eran formas no clásicas del déficit en 21-hidroxilasa (Fig. 4. 3: familias 15, 18, 19, 21, 23, 29, 35, 38, 39, 49 y 50).

##### **4.4.1. Análisis de la segregación de los haplotipos HLA en las familias tipadas.**

Teniendo en cuenta la estrecha relación genética existente entre el gen de la 21-hidroxilasa y el sistema mayor de histocompatibilidad (HLA), el análisis de la segregación de los haplotipos HLA en familias con al menos un hijo afecto, permite de forma rápida, como seguidamente se describirá, una primera aproximación diagnóstica, ya que a partir del conocimiento de los haplotipos HLA de riesgo presentes en el paciente afecto, se puede identificar los miembros heterocigotos en la familia (progenitores), conocer qué hermanos asintomáticos del caso índice son o no portadores también del gen con el defecto enzimático (formas crípticas o hermanos *sanos*) y por lo tanto realizar un completo consejo genético a la familia, complementado, a ser posible, con la información que también aportará el análisis del test de ACTH practicado a cada uno de los miembros familiares en un Nomograma de referencia y el estudio genético molecular específico del gen 21-hidroxilasa.

Ahora bien, esto es posible, únicamente en aquellas familias que ya tengan un hijo afecto de HSC, ya que sino es necesario esperar al estudio genético molecular específico del gen.

En el estudio se observa que, independientemente de la forma clínica a la que pertenezcan, en todas las familias tipadas con más de un descendiente afecto de déficit en 21-hidroxilasa, excepto la familia 39, los descendientes afectados dentro del mismo seno familiar, tienen idéntico tipaje HLA (familia 3, 10, 15 y 23), lo que permite definir, dentro de cada familia, unos haplotipos de riesgo a presentar la enfermedad que pueden ser distintos en cada una de ellas y de gran utilidad en el diagnóstico prenatal.

En la familia 39, la segunda hija afecta de forma NC, que comparte únicamente uno de los dos haplotipos HLA con su primera hermana afecta también de forma NC, fue inicialmente una forma críptica que en una reevaluación periódica finalmente presentó sintomatología, necesitando de tratamiento y pasando entonces a ser considerada como forma NC.

Se observa también, que cada progenitor es transmisor de un haplotipo HLA portador del gen con el déficit en 21-hidroxilasa a sus descendientes afectados, por lo que todos ellos son obligados portadores heterocigotos.

Añadir, que los hermanos considerados formas crípticas por presentar los valores del test de ACTH ligeramente elevados, todos ellos pertenecientes a familias con forma NC del déficit, comparten uno o los dos haplotipos HLA con su hermano afecto (familias 15, 21, 29, 35, 38, 39, 49 y 50), siendo estos, sorprendentemente, asintomáticos. Mientras que los hermanos *sanos* con tasas de 17-OHP normales, no comparten ningún haplotipo con el hermano afecto (familia 7, 18 y 50), por lo que presumiblemente no son portadores del gen con el defecto enzimático.

#### ***4.4.2. Desequilibrio de asociación entre los antígenos HLA y el déficit en 21-hidroxilasa.***

Por otro lado, también está descrita la existencia de un desequilibrio de asociación entre ciertos antígenos HLA y el déficit en 21-hidroxilasa, es decir, que en pacientes con el déficit enzimático, ciertos antígenos HLA aparecen significativamente aumentados o disminuidos respecto a lo observado en la población general. De ahí que se analice a continuación, este desequilibrio de asociación en los grupos de individuos tipados.

En la tabla IV. II. se muestran las frecuencias de aquellos antígenos HLA de clases I y II que encontramos asociados a nuestros pacientes con HSC teniendo en cuenta su forma clínica (formas clásicas (SW + SV) y formas no clásicas (NC)), comparadas con las de la población control.

Por lo que se refiere a los antígenos de clase I, se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre algunos de ellos y las formas clínicas del déficit. El antígeno A2 no mostró asociación significativa, en este estudio, con el grupo de pacientes con formas clásicas del déficit respecto al grupo control (40% vs. 46,2%).

En nuestro pequeño grupo de pacientes con formas clásicas del déficit en 21-hidroxilasa (n= 5), la frecuencia del antígeno A33 fue del 40% (R.R.= 15,2) y en el grupo de pacientes con formas no clásicas (n= 14) fue de 21,4% (R.R.= 6,2) mostrando en ambos casos una elevación significativa comparada con el grupo control ( $p < 0,01$ ).

**Tabla IV. II:** Frecuencias de ciertos antígenos HLA en los tres grupos de pacientes considerados y grupo control.

ANTIGENOS HLA	<u>FORMAS CLASICAS</u> (SW + SV) (n = 5)		<u>FORMAS NO CLASICAS</u> (NC) (n = 14)		<u>CONTROLES</u> (n = 1337)	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
A 2	2	40	9	64,3	618	46,2
A 33	2	<b>40**</b>	3	<b>21,4**</b>	56	4,2
B 5 (w51)	5	<b>100****</b>	3	21,4	237	17,7
B 14 (64;65)	2	40	12	<b>85,7****</b>	149	11,1
DR 1	2	40	13	<b>92,8****</b>	266	19,9
DR 2	1	20	1	7,1	288	21,5
DR 3	—	—	1	7,1	336	25,1
DR 4	4	<b>80**</b>	1	7,1	242	18,1
DR 5	2	40	2	14,3	365	27,3
DRw 6	—	—	1	7,1	184	13,8
DR 7	1	20	2	14,3	438	32,7
DQw 1	3	60	13	<b>92,8**</b>	742	55,5
DQw 2	1	20	3	21,4	667	49,9
DQw 3	4	80	4	28,6	667	49,9
B 14 - DR 1	2	<b>40****</b>	12	<b>85,7****</b>	27	2

SW: Forma clásica con pérdida salina; SV: Forma virilizante simple; NC: Forma no clásica.

[\* < 0,05 \*\* < 0,01 \*\*\* < 0,001 \*\*\*\* < 0,0001] vs. Controles normales.

El antígeno B5 (w51) sólo se encontró significativamente incrementado en el grupo de pacientes con formas clásicas, comparado con el grupo control (100% vs. 17,7%;  $p < 0,0001$ ). Por su parte, el antígeno B14 (64;65) se encontró más frecuentemente en los pacientes con formas no clásicas respecto al grupo control (85,7% vs. 11,1%;  $p < 0,0001$ ; R.R.= 47,8).

Es importante resaltar que el antígeno HLA-Bw47 en este estudio, no se ha detectado en ninguno de los dos grupos de pacientes considerados.

Por otro lado, se encontraron antígenos de clase II que presentaban enlace genético desequilibrado con la deficiencia en 21-hidroxilasa en nuestra población estudio. El antígeno DR1 se mostró significativamente aumentado en los pacientes con formas no clásicas, comparado con el grupo control (92,8% vs. 19,9%;  $p < 0,0001$ ; R.R.= 52,3), observándose al mismo tiempo en este grupo de pacientes una disminución de la frecuencia del resto de antígenos DR, aunque no estadísticamente valorable.

En el grupo de pacientes con formas clásicas, el antígeno DR4 se encontró con una frecuencia del 80% (R.R.= 18,1), mostrando una elevación significativa respecto al grupo control ( $p < 0,01$ ). También se observaron ligeramente aumentados, aunque no significativamente, los antígenos DR1 y DR5.

El antígeno DQw1 se ha detectado en el 92,8% (R.R.= 10,4) de los pacientes con formas no clásicas y sólo en el 55,5% de los controles ( $p < 0,01$ ). Este incremento del antígeno DQw1, es debido a un desequilibrio de asociación existente con los antígenos DR1 y DR2. De igual modo, el incremento de la frecuencia del antígeno DQw3, no significativo respecto al grupo control, observado en los pacientes con formas clásicas, es consecuencia del desequilibrio de asociación con los antígenos DR4 y DR5.

No se demostró desequilibrio en el enlace genético entre ningún haplotipo HLA y las formas clásicas del déficit en 21-hidroxilasa. Por el contrario, las formas no clásicas presentaron desequilibrio de asociación con el haplotipo B14-DR1, el cual se detectó en el 85,7% (R.R.= 291,1) de estos pacientes, mostrando una elevación muy significativa comparado con el grupo control ( $p < 0,0001$ ).

Probablemente, el incremento significativo del haplotipo B14-DR1 encontrado en el grupo de pacientes con formas clásicas del déficit comparado con el grupo control (40% vs. 2%;  $p < 0,0001$ ), es consecuencia del reducido número de pacientes estudiados que componen este grupo, de ahí que deba de ser tenido en consideración limitada.

La distribución de los antígenos de clases I y II encontrada en nuestros progenitores, hermanos con formas crípticas (todos ellos pertenecientes a familias de forma no clásica) y hermanos *sanos* con relación a los de la población control, se expresa en la tabla IV.III. El antígeno A2 no mostró asociación significativa con ninguno de los grupos de individuos anteriormente citados. El antígeno A33 se encontró significativamente aumentado en los progenitores y en las formas crípticas, comparado con el grupo control (21,4% vs. 4,2%;  $p < 0,0001$ ; R.R.= 6,2 y 36,4% vs. 4,2%;  $p < 0,0001$ ; R.R.= 13,1 respectivamente) como se observa al considerar el total de pacientes

con HSC (26,3%;  $p < 0,0001$ ), sin embargo, en los hermanos *sanos*, este antígeno no se mostró.

Si tenemos en cuenta que, el antígeno B5 (w51) sólo se encontró significativamente incrementado en los pacientes con formas clásicas del déficit, es lógico entonces no observar, tanto en el grupo de progenitores como en las formas crípticas, desviaciones significativas en la frecuencia de este antígeno, a diferencia de lo que cabría esperar, ya que de los 28 progenitores tipados, únicamente 6 de ellos pertenecen a familias con forma clásica y por su parte todas las formas crípticas son de familias con forma no clásica del déficit. Así pues, es posible hablar de la existencia de desequilibrio de asociación entre HLA-B5 (w51) y la forma clásica en nuestra población.

**Tabla IV.III:** Frecuencia de ciertos antígenos HLA en los grupos de individuos estudiados y grupo control.

ANTIGENOS HLA	PROGENITORES (n = 28)		HERMANOS FORMAS CRÍPTICAS (n = 11)		HERMANOS NO AFECTOS (n = 8)		TOTAL PACIENTES HSC (n = 19)		CONTROLES (n = 1337)	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
A 2	13	46,4	6	54,5	5	62,5	11	57,9	618	46,2
A 33	6	21,4****	4	36,4****	—	—	5	26,3****	56	4,2
B 5 (w51)	7	25	1	9,1	1	12,5	8	42,1**	237	17,7
B 14 (64;65)	12	42,8****	8	72,7****	—	—	14	73,7****	149	11,1
DR 1	15	53,6****	8	72,7****	2	25	15	78,9****	266	19,9
DR 2	6	21,4	1	9,1	—	—	2	10,5	288	21,5
DR 3	4	14,3	5	45,4	3	37,5	1	5,3	336	25,1
DR 4	4	14,3	—	—	—	—	5	26,3	242	18,1
DR 5	6	21,4	1	9,1	3	37,5	4	21	365	27,3
DRw 6	5	17,8	1	9,1	1	12,5	1	5,3	184	13,8
DR 7	6	21,4	1	9,1	3	37,5	3	15,8	438	32,7
DQw 1	19	67,8	8	72,7	4	50	16	84,2*	742	55,5
DQw 2	8	28,6*	5	45,4	7	87,5	4	21*	667	49,9
DQw 3	9	32,1	1	9,1**	2	25	8	42,1	667	49,9
B 14 - DR 1	11	39,3****	6	54,5****	—	—	14	73,7****	27	2

HSC: Hiperplasia Suprarrenal Congénita.

[\*  $< 0,05$  \*\*  $< 0,01$  \*\*\*  $< 0,001$  \*\*\*\*  $< 0,0001$ ] vs. Controles normales.

Tanto en los progenitores como en las formas crípticas, se encontró el antígeno B14 (64;65) significativamente incrementado comparado con el grupo control (42,8% vs. 11,1%;  $p < 0,0001$ ; R.R.= 5,9 y 72,7% vs. 11,1%;  $p < 0,0001$ ; R.R.= 21,2 respectivamente), al igual que fue descrito anteriormente en los pacientes con formas clásicas del déficit. Ahora bien, es importante resaltar que ninguno de los hermanos *sanos* presentó este antígeno, lo que nos confirma la existencia de enlace genético desequilibrado entre HLA-B14 (64;65) y la forma no clásica en nuestra población.

Respecto a los antígenos de clase II, se observó que tanto en los progenitores como en las formas crípticas, el antígeno DR1 estaba significativamente incrementado

con relación al grupo control (53,6% vs. 19,9%;  $p < 0,0001$ ; R.R.= 4,6 y 72,7% vs.19,9%;  $p < 0,0001$ ; R.R.= 10,7 respectivamente), no mostrándose este aumento en el grupo de hermanos *sanos*.

Resaltar que el aumento anteriormente descrito del antígeno DR4 en las formas clásicas, no se observa en los progenitores y destacar ausencia total de este antígeno, tanto en las formas crípticas como en los hermanos *sanos*, siendo un posible candidato a tener en cuenta como marcador genético asociado a formas clásicas en nuestra población.

La diferente distribución observada de los antígenos DQw en estos grupos de individuos, es debida únicamente al desequilibrio de asociación conocido con los respectivos antígenos DR.

También se encontró el haplotipo B14-DR1 significativamente incrementado en los progenitores (39,3% vs. 2%;  $p < 0,0001$ ; R.R.= 31,4) y en las formas crípticas (54,5% vs. 2%;  $p < 0,0001$ ; R.R.= 58,2) respecto al grupo control; observándose al mismo tiempo ausencia total de este haplotipo en los hermanos *sanos*.

Finalmente, es importante señalar que todos nuestros individuos con haplotipos B14-DR1 manifestaban concentraciones elevadas de 17-OHP en respuesta a la estimulación con ACTH. Ahora bien, debemos tener en cuenta que es posible presentar tanto el defecto clásico como el no clásico del gen 21-hidroxilasa, sin tener asociado el antígeno HLA con enlace genético desequilibrado con la deficiencia en 21-OH (ej. familias 18 y 49 en las que los pacientes son formas no clásicas y no presentan asociado el haplotipo B14-DR1). De ahí, la importancia de realizar paralelamente el estudio directo del gen CYP21B, para llegar a conocer cuales son exactamente las alteraciones génicas presentes en el paciente y familiares, permitiéndonos efectuar seguidamente la correlación entre estas lesiones observadas y el grado de afección de la actividad en 21-hidroxilasa.

#### **4.5. ANÁLISIS GENÉTICO MOLECULAR DEL GEN 21-OH**

A un total de 211 individuos pertenecientes a las 53 familias motivo de estudio, se les ha realizado el análisis directo del gen 21-hidroxilasa con el fin de determinar la presencia de grandes reordenamientos como son, deleciones, duplicaciones, grandes conversiones en esta región genómica y la detección de nueve de las mutaciones puntuales más comunes, obteniéndose los siguientes resultados:

#### 4.5.1. Lesiones génicas encontradas en los pacientes con déficit en 21-hidroxilasa.

Los resultados del análisis génico correspondiente a nuestros pacientes incluidos en el estudio se muestran en la tabla IV.IV.

**Tabla IV.IV:** Frecuencia de las lesiones génicas encontradas en los tres grupos de pacientes con déficit en 21-hidroxilasa.

	FENOTIPOS							
	SW (n=13)		SV (n=5)		NC (n=53)		TOTAL (n=71)	
<b>Cromosomas no emparentados:</b>	22		6		78		106	
<b>P30L</b>	—	—	—	—	4	5,12%	4	3,77%
<b>Intrón 2</b>	11	50%	3	50%	5	6,41%	19	17,92%
<b>Deleción 8-pb</b>	2	9,09%	—	—	—	—	2	1,88%
<b>I172N</b>	2	9,09%	1	16,66%	3	3,84%	6	5,66%
<b>V281L</b>	1	4,54%	3	50%	48	61,53%	52	49,05%
<b>G318X</b>	—	—	—	—	1	1,28%	1	0,94%
<b>R339H</b>	—	—	—	—	—	—	—	—
<b>R356W</b>	1	4,54%	—	—	1	1,28%	2	1,88%
<b>P453S</b>	4	18,18%	—	—	3	3,84%	7	6,60%
<b>Deleción CYP21B</b>	5	22,72%	—	—	1	1,28%	6	5,66%
<b>Conversión CYP21B</b>	2	9,09%	—	—	1	1,28%	3	2,83%
<b>Duplicación CYP21A</b>	—	—	—	—	4	5,12%	4	3,77%
<b>Deleción CYP21A</b>	—	—	—	—	2	2,56%	2	1,88%
<b>MND</b>	—	—	—	—	11	14,10%	11	10,38%
<b>Mutaciones:</b>	28	100%	7	100%	67	85,90%	95	89,62%

SW: Forma clásica con pérdida salina; SV: Forma virilizante simple; NC: Forma no clásica; MND: Mutación no detectada.

La metodología utilizada ha permitido detectar la mutación causal en el 89,62% de los cromosomas estudiados, considerando la muestra en su conjunto (formas SW, SV y NC).

En el grupo de pacientes perdedores de sal (SW) se identificaron mutaciones severas en el 100% de los cromosomas. Además, algunos de estos pacientes incluyen en un mismo cromosoma varias mutaciones severas y leves que afectan al gen CYP21B, de ahí que el número total de mutaciones detectadas en este grupo (28), sea superior al de cromosomas no emparentados estudiados (22).

La mutación puntual más frecuente en estas formas SW, ha sido el cambio A/C por G en la posición 655 en el intrón 2, generando un sitio alternativo de procesado del RNA mensajero en un 50% de los casos. Las deleciones del gen CYP21B se

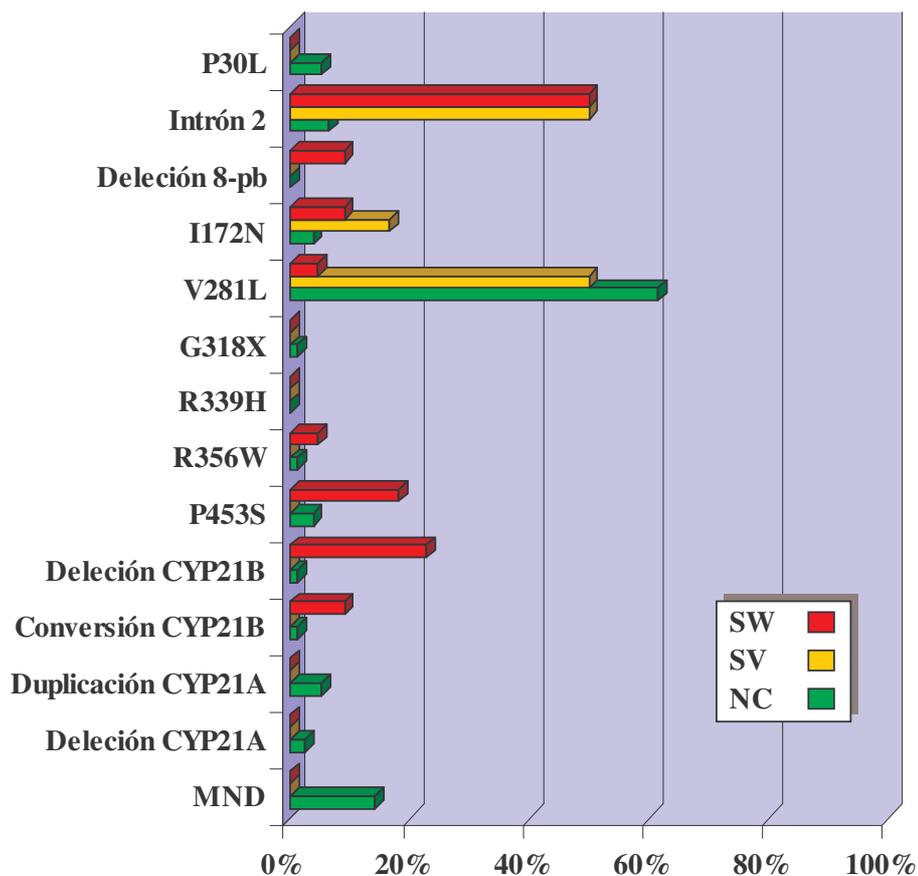
encontraron en 5 de los 22 cromosomas de formas SW (22,72%) y se observaron grandes conversiones del gen CYP21B en 2 de los 22 cromosomas de estas formas (9,09%). En ninguno de los pacientes con forma SW se encontraron duplicaciones ni deleciones del pseudogen CYP21A.

Otras mutaciones puntuales encontradas en estas formas SW fueron: la deleción de 8 pares de bases en el exón 3 (9,09%) y la I172N en el exón 4 (9,09%). La mutación G318X, típica de formas SW, no se encontró representada en esta serie. Tanto la mutación R356W (4,54%) como la P453S (18,18%) se presentaron asociadas a la mutación intrón 2 sobre un mismo cromosoma afecto (pacientes familias 1, 2, 6 y 11). Mientras que, la mutación V281L (4,54%) se mostró asociada a I172N (paciente familia 10), lo que explica la presencia de mutaciones puntuales leves, es decir, asociadas a formas NC, en este grupo de pacientes.

Por lo que se refiere a los pacientes con forma virilizante simple (SV) se detectaron también el 100% de las mutaciones en sus cromosomas, encontrándose, además, en uno de ellos (paciente familia 14), varias mutaciones asociadas en un mismo cromosoma, es decir, una mutación severa (intrón 2) en homocigosis con una mutación leve (V281L) en heterocigosis. En estas formas SV, la mutación intrón 2 (50%) y la V281L (50%) se han encontrado con la misma frecuencia, mientras que la frecuencia de la mutación I172N, típica de formas virilizantes simples, fue de tan sólo el 16,66%, todo ello podría ser debido al reducido número de pacientes estudiados en esta serie.

Finalmente, en el grupo de pacientes con la forma no clásica del déficit (NC) la mutación causal fue identificada en el 85,9% de sus cromosomas mediante la metodología empleada en este estudio, no permitiendo por lo tanto, la caracterización de la mutación en 11 de los 78 cromosomas no clásicos estudiados (14,1%). La mutación puntual que se encontró con mayor frecuencia en estas formas NC fue el cambio V281L (61,53%). Las mutaciones P30L y P453S descritas como causantes de formas no clásicas se detectaron en un 5,12% y 3,84% respectivamente, en estos pacientes. Doce de las formas no clásicas (15,4%) presentaron en heterocigosis, alelos asociados a formas clásicas (SW+SV): deleción del gen CYP21B (1,28%) (paciente familia 36); conversión grande del gen CYP21B (1,28%) (paciente familia 45); sitio alternativo de procesamiento del RNA mensajero en el intrón 2 en cinco casos (6,41%) (pacientes familias 26, 37, 39, 50 y 53); la mutación I172N en tres casos (3,84%) (pacientes familias 15; 31 y 34); parada en el codón 318 (1,28%) (paciente familia 40) y la mutación R356W (1,28%) (paciente familia 24). Las duplicaciones del pseudogen

CYP21A se encontraron en 5,12% de los cromosomas de estas formas NC, en los 4 casos asociadas a la mutación puntual V281L (pacientes familias 21, 29, 38 y 42). Las deleciones del pseudogen CYP21A únicamente se encontraron en formas NC (2,56%) (Fig. 4. 14.).



**Figura 4.14:** Deleciones, duplicaciones, conversiones y mutaciones puntuales detectadas en los pacientes con forma SW, SV y NC.

#### 4.5.2. Análisis mutacional en los familiares de los pacientes. Detección de portadores.

Una vez identificadas las mutaciones en los pacientes, se realizó el mismo estudio genético del gen 21-hidroxilasa a sus familiares (100 progenitores y 40 hermanos clínicamente no afectados), analizando seguidamente la segregación de las mutaciones encontradas en cada uno de los árboles familiares, con el fin de poder establecer los

haplotipos de cada uno de los individuos estudiados; identificar las mutaciones originadas *de novo* y conocer los portadores en cada seno familiar.

En todas aquellas familias en que los progenitores pudieron ser estudiados, la mutación se encontró en uno de los progenitores (portadores), excepto en dos casos (3,7%) de la forma no clásica en los que únicamente el padre era portador de la mutación, mientras que la madre no presentaba lesión génica en ninguno de sus dos cromosomas (familia 36 y familia 43). Ello indica que en estos dos casos, las mutaciones se habían originado *de novo*.

De todos estos progenitores portadores, se observa que independientemente del tipo de mutación presente, 91 son *heterocigotos*, es decir en uno de sus cromosomas no se encuentra lesión alguna en el gen 21-hidroxilasa, mientras que en el otro cromosoma presentan las alteraciones génicas identificadas en sus hijos afectados, y 7 son *homocigotos*, de los que cuatro son homocigotos para una mutación (familias 9, 21, 26 y 48) y tres son dobles heterocigotos para las mutaciones (familias 37, 43 y 53). Asintomáticos todos ellos.

Al efectuar el análisis de segregación de las mutaciones en cada una de las familias, se han establecido los haplotipos de todos los individuos estudiados, tal y como se observa en cada uno de los árboles genealógicos. Gracias a ello podemos observar que, todos los hermanos afectados dentro de una misma familia, presentan idénticos haplotipos mutacionales fuera cual fuese el grupo clínico al que pertenezcan excepto los de las familias 28, 39, y 41. En estos tres casos, se encontró que las segundas hijas afectas de forma NC con genotipo V281L/N, solo comparten uno de los dos cromosomas afectados con su primer hermano/a con déficit también de forma NC y que al inicio de este estudio eran formas crípticas que a lo largo de éste, presentaron sintomatología, precisando de tratamiento y convirtiéndose en pacientes.

Al tratarse de una enfermedad hereditaria autosómica recesiva, es de esperar que los pacientes con el déficit enzimático, independientemente de su forma clínica, presenten anomalías en el gen 21-hidroxilasa en los dos cromosomas. Así pues, considerando la muestra de pacientes en su conjunto, se observa que contrariamente a lo esperado, 15 de nuestros pacientes con la forma no clásica, únicamente presentan mutaciones del gen CYP21B en uno de sus cromosomas, complicándose obviamente el realizar un diagnóstico prenatal fiable en este grupo de pacientes. De ahí que en el análisis hormonal, el grupo de afectados de forma no clásica fuese subdividido, como ya

se indicó, en NC *homocigotos* y NC *heterocigotos*, con el fin de caracterizar mejor a este grupo.

Como muestra la tabla IV.V, al analizar conjuntamente los 15 pacientes con forma NC *heterocigotos*, no se encuentra ninguna característica en común que pueda facilitar el diagnóstico prenatal. Se puede resaltar que todos son niñas excepto uno. Según el genotipo que presentan se distribuyen en cuatro grupos, de los cuales el que incluye mayor número de pacientes es V281L / MND. Además, la segregación de la mutación en todos los casos es paterna, excepto en dos de ellos que es materna y el análisis del test de la ACTH practicado a todos ellos, muestra valores basales de 17-OHP poco indicativos y post estímulo moderadamente elevados.

**Tabla IV.V:** Análisis del conjunto de pacientes con forma N.C. *heterocigotos*.

FORMAS NO CLASICAS HETEROZIGOTOS							
Nº	GENOTIPO	SEXO	TRANSMISION MUTACION	EXPRESION CLINICA	EDAD DIAGNOSTICO	17OHP basal (nmol/L)	17OHP post (nmol/L)
1	V281L/MND	♀	Paterna	Pubarquia	8a. 6m.	4,8	20,7
2		♀	Paterna	Pubarquia	5a. 8m.	2,2	11,5
3		♀	Paterna	Pubarquia	5a. 8m.	4,8	19,7
4		♀	Paterna	Pubertad Precoz	7a. 6m.	5,4	27,2
5		♀	Paterna	Hirsutismo	8a. 3m.	5,2	19,8
6		♀	Paterna	Hirsutismo	15a.	1,9	10,8
7		♀	<b>Materna</b>	Pubertad Precoz	8a. 1m.	10,9	15,1
8		♀	Paterna	Pubarquia	5a. 11m.	2,3	12,5
9		♀	<b>Materna</b>	Pubarquia	8a. 9m.	29,6	35,3
10		♀	Paterna	Pubarquia	3a. 2m.	2,7	15,9
11	V281L/N	♀	Paterna	Pubarquia	5a. 6m.	6,9	13,2
12		♀	Paterna	Pubarquia	7a. 3m.	8	28,1
13		♀	Paterna	Amenorrea secundaria Hirsutismo	16a.	16,7	21,6
14	I172N/MND	♀	Paterna	Acné	7a.	6,8	11,7
15	DelA;In2;P453S/DelA	♂	Paterna	Ginecomastia Obesidad	12a.	5,9	16

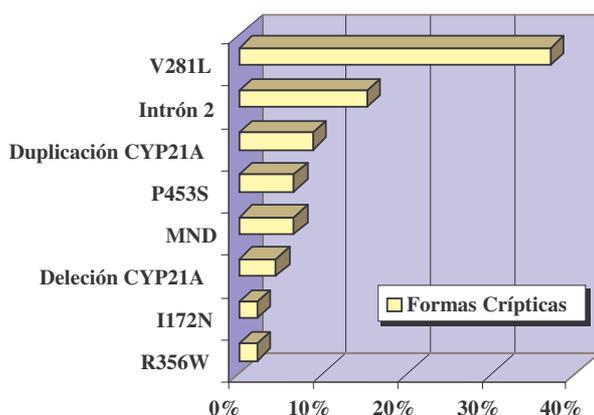
MND: Mutación no detectada; N: Normal.

Por último, el análisis molecular de los 40 hermanos clínicamente no afectados muestra que 14 de ellos no presentan alteraciones en el gen CYP21B en ninguno de sus dos cromosomas, mientras que los otros 26 son formas crípticas, es decir, sujetos asintomáticos con leve hiperandrogénia biológica y todos ellos portadores de anomalías

en el gen de la 21-hidroxilasa en uno o los dos cromosomas. Las 5 formas crípticas pertenecientes a familias con afectos de la forma clásica (SW+SV) presentan todas ellas mutaciones severas únicamente en uno de sus cromosomas (familias 6, 9, 11, 13 y 14). Mientras en las restantes 21 formas crípticas, todas ellas pertenecientes a familias con afectos de la forma no clásica, se encuentra que, 17 de ellas tienen mutaciones leves o severas también únicamente en uno de sus cromosomas (familias 16, 21, 24, 25, 29, 35, 37, 39, 49, 50, 51 52 y 53) y las otras 4 son todas ellas homocigotas para la mutación V281L asociada con la forma NC (familias 21, 22, 38 y 47). En todos ellos, los valores de 17-OHP post estimulación con ACTH obtenidos fueron superiores a 9,1 nmol/L.

La mutación puntual que se encontró más frecuentemente en las formas crípticas (Fig. 4.15.) ha sido el cambio Val281Leu (17/46; 36,95%). Otras mutaciones puntuales encontradas fueron: el cambio A/C por G en la posición 655 en el intrón 2 (7/46; 15,22%); la mutación P453S (3/46; 6,52%) y con idéntica frecuencia las mutaciones I172N y R356W (1/46; 2,17%). Las deleciones del pseudogen CYP21A se presentaron con frecuencias próximas a las descritas para la población normal (4,35% vs. 5-15%). Las duplicaciones del pseudogen CYP21A se encontraron en 8,69% de los cromosomas de formas crípticas, en todos los casos asociadas a la mutación puntual V281L.

No se detectó la mutación causal (MND) en 3/46 (6,52%) cromosomas de las formas crípticas estudiadas.



**Figura 4. 15:** Frecuencia de las lesiones genéticas detectadas en las formas crípticas.

#### 4.6. CORRELACIÓN ENTRE EL TIPAJE HLA Y LAS ANOMALÍAS DEL GEN 21-HIDROXILASA DETECTADAS EN LOS PACIENTES

Con el fin de poder establecer alguna asociación entre el tipaje HLA y las lesiones génicas descritas en nuestros pacientes, se muestran en la tabla IV.VI los haplotipos HLA presentes en los pacientes de las 14 familias tipadas, agrupados según las lesiones génicas observadas en ellos.

Ningún haplotipo HLA mostró desequilibrio de asociación con mutaciones severas asociadas a la forma “pérdida salina” y virilizante simple.

Por el contrario, el haplotipo HLA-B14(64;65)DR1 se encontró totalmente asociado con la mutación V281L, asociada esta a su vez a la forma no clásica del déficit en nuestra población.

**Tabla IV.VI:** Haplotipos HLA de los pacientes, agrupados en función de las lesiones génicas detectadas.

HLA (paterno) / (materno)	MUTACION	FENOTIPO
B5 (w51) DR7 / B7 DR2	Conversión / In 2	SW
B5 (w51) DR5 / B13 DR4 n = 2*	In 2 / In 2	SW
B14 (64;65) DR1 / Bw57 (17) DR2	V281L / In 2	NC
B5 (w51) DR7 / B14 (64;65) DR1	In 2 / V281L	NC
B5 (w51) DR4 / B14 (64;65) DR1 n = 2*	I172N / I172N; V281L	SW / SV
B14 (64;65) DR1 / B7 DR1 n = 2*	V281L / I172N	NC
B14 (64;65) DR1 / B18 DR5 n = 2*	V281L / P30L	NC
B14 (64;65) DR1 / B- DR8	V281L / N	NC
B14 (64;65) DR1 / B14 (64;65) DR3	Dup A; V281L / V281L	NC
B14 (64;65) DR1 / B14 (64;65) DR1		NC
B14 (64;65) DR1 / B44 DR1		NC
B5 (w51) DR4 / B62 DR10	V281L / MND	NC
B14 (64;65) DR1 / B35 DR1		NC
B5 (w51) DR6 / B14 (64;65) DR1	MND / V281L	NC
B55 DR7 / B44 DR1		NC

SW: Forma clásica con pérdida salina

SV: Forma virilizante simple

NC: Forma no clásica

MND: Mutación no detectada

N: Normal

\*: Hermanos

#### 4.7. CORRELACIÓN GENOTIPO – FENOTIPO

Para poder interpretar las correlaciones entre el genotipo y el fenotipo, se han distribuido a los pacientes estudiados en 27 grupos diferentes de mutaciones (Tabla IV.VII). Se obtuvo una adecuada correspondencia entre los genotipos detectados y los fenotipos presentados por los pacientes, excepto en 2 de ellos que mostraban fenotipo diferente al esperado.

**Tabla IV.VII:** Correlación genotipo-fenotipo en los pacientes analizados.

GENOTIPOS	FENOTIPOS OBSERVADOS	FENOTIPOS ESPERADOS
In 2; R356W / In 2	2 SW	SW
Conversión / In 2; P453S	1 SW; 1 SV	SW / SV
In 2 / In 2	2 SW	SW
Del 8 pb / Del 8 pb	1 SW	SW
Del B / Del B	2 SW	SW
In 2; P453S / In 2; P453S	1 SW	SW
Conversión / In 2	1 SW	SW
Del B / In 2	1 SW	SW
I172N / I172N; V281L	1 SW ; 1 SV	SV
In 2 / In 2; P453S	1 SW	SW
V281L / V281L	1 SV ; 13 NC	NC
In 2 / I172N	1 SV	SV
In 2; V281L / In 2	1 SV	SV
V281L / I172N	3 NC	NC
Dup A; V281L / V281L	5 NC	NC
V281L / P30L	3 NC	NC
R356W / V281L	1 NC	NC
V281L / P453S	1 NC	NC
In 2 / V281L	5 NC	NC
V281L / Del B	1 NC	NC
G318X / P453S	2 NC	NC
P30L / P30L	1 NC	NC
V281L / Conversión	3 NC	NC
Del A; In 2; P453S / Del A	1 NC	NC
V281L / MND	10 NC	NC
V281L / N	3 NC	NC
I172N / MND	1 NC	NC

SW: Forma clásica con pérdida salina.

SV: Forma virilizante simple.

NC: Forma no clásica.

MND: Mutación no detectada.

N: Normal.

Esta discordancia encontrada corresponde a:

- Una niña que presentó un cuadro de deshidratación grave con pérdida salina al mes de vida, junto con una ambigüedad de genitales externos de grado III de Prader y valores de 17-OHP basales de 1248 nmol/L, que precisó de un tratamiento con hidrocortisona y 9 $\alpha$ -fluorhidrocortisona para su compensación, signos clínicos correspondientes al diagnóstico forma “pérdida salina”. El análisis molecular del gen 21-hidroxilasa que se le practicó, muestra un genotipo I172N / I172N;V281L. De manera que, si se tiene presente que el fenotipo es el resultado de la combinación de anomalías del gen CYP21B de los dos cromosomas, es lógico esperar en un paciente homocigoto para la mutación I172N el fenotipo de forma virilizante simple, ya que como se conoce, esta mutación da una proteína que tiene una actividad enzimática muy disminuida (3-7%) *in vitro*.
- Un niño con forma virilizante simple del déficit que había presentado varios episodios de vómitos y deshidratación leve, sin pérdida salina, a los 7 meses de vida, acompañado de hiperpigmentación escrotal y con valores basales de 17-OHP de 45,9 nmol/L y post estímulo con ACTH de 682 nmol/L; precisando para su compensación de un tratamiento con hidrocortisona y 9 $\alpha$ -fluorhidrocortisona. El estudio génico realizado, permitió saber que se trataba de un paciente homocigoto para la mutación V281L asociada como sabemos a la forma no clásica del déficit, sin encontrarsele otra lesión que afectase al gen CYP21B, por lo que el fenotipo esperado en este paciente V281L / V281L fuese el de una forma no clásica.

De los 71 pacientes estudiados, en 69 existe una concordancia entre el genotipo y el fenotipo (97,2%), y únicamente en dos de ellos (2,8%) hay una discordancia.

